

Mechanismen der C-Domänen-vermittelten Lipoinitiation in der nichtribosomalen Peptidsynthese

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Femke Kraas

aus St. Peter-Ording

Marburg/Lahn, 2012

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als
Dissertation am _____._____._____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Graumann
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg

Tag der Disputation: 12.12.2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit vom Oktober 2009 bis zum September 2012 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Erklärung

(gemäß § 10, Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen
Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 15.07.2009)

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Mechanismen der C-Domänen-vermittelten Lipoinitiation in der nichtribosomalen Peptidsynthese“ selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift Femke Kraas

Publikationen:

Der Hauptteil der hier vorgestellten Arbeiten wurde bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Femke I. Kraas, Verena Helmetag, Melanie Wittmann, Matthias Strieker und Mohamed A. Marahiel

„Functional Dissection of Surfactin Synthetase Initiation Module Reveals Insights into the Mechanism of Lipoinitiation“

Chemistry & Biology, **2010**, *17*, 872-880.

Femke I. Kraas, Tobias W. Giessen, Mohamed A. Marahiel

„Exploring the mechanism of lipid transfer during biosynthesis of the acidic lipopeptide antibiotic CDA“

FEBS Letters, **2012**, *586*, 283-288.

Weitere Publikationen der Autorin:

Tobias W. Giessen, **Femke I. Kraas**, Mohamed A. Marahiel

„A four-enzyme pathway for 3,5-dihydroxy-4-methylanthranilic acid formation and incorporation into the antitumor antibiotic sibiromycin.“

Biochemistry, **2011**, *50*, 5680-5692.

Tobias W. Giessen, Kamila B. Franke, Thomas A. Knappe, **Femke I. Kraas**, Mattia Bosello, Xiulan Xie, Uwe Linne und Mohamed A. Marahiel

„Isolation, Structure Elucidation, and Biosynthesis of an Unusual Hydroxamic Acid Ester-Containing Siderophore from *Actinosynnema mirum*“

J. Nat. Prod., **2012**, *75*, 905-914.

Wissenschaftlicher Werdegang:

Femke Kraas

geboren am 14.03.1985 in Husum

Email: Kraas@students.uni-marburg.de

Oktober 2009 – Dezember 2012

Promotion

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie

Arbeitskreis Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel

Januar 2009 – Oktober 2009

Diplomarbeit

„Untersuchungen zur Aufklärung von Lipoinitiations-
mechanismen in der nichtribosomalen Peptidsynthese“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie

Arbeitskreis Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel

Oktober 2004 – Dezember 2009

Chemiestudium

Philipps-Universität Marburg

Juni 2004

Hochschulreife

Nordseegymnasium St. Peter-Ording

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein (1879-1955, theoretischer Physiker)

Zusammenfassung

Nichtribosomal synthetisierte Lipopeptide aus mikrobiellen Organismen weisen ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten auf, zu denen beispielsweise antibiotische, antitumorale aber auch biotensidische Eigenschaften zählen. Daher sind diese Naturstoffe von pharmazeutischem sowie biotechnologischem Interesse und stellen einen Gegenstand intensiver gegenwärtiger Forschung dar. Die Biosynthese dieser Lipopeptide beginnt in der Regel mit der Inkorporation des Fettsäurerestes, die durch eine *N*-Acylierung des Peptidrückgrats stattfindet und als Lipoinitiation bezeichnet wird. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung verschiedener Lipoinitiationsmechanismen, zu denen die Aktivierung und die Übertragung des Fettsäurerests gehört. In den Biosynthesewegen des Lipoheptapeptids Surfactin aus *Bacillus subtilis* und des sauren Lipodepsipeptids CDA (engl.: *calcium-dependent antibiotic*) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) konnten diese Reaktionen biochemisch charakterisiert werden. Diese stellen zwei neue Strategien der Lipoinitiation dar. Dazu wurden die beteiligten Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) heterolog als singuläre Proteine produziert und die Substrate, sofern nötig, chemisch synthetisiert. In den biochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass in beiden Reaktionen die Kondensations(C)-Domäne des Initiationsmoduls der jeweiligen Peptidsynthetase als Acyltransferase wirkt und für den Transfer der Fettsäure essentiell ist. Die Notwendigkeit des aus anderen C-Domänen bekannten katalytisch aktiven Motivs HHxxxDG konnte durch Mutationsstudien in den hier untersuchten Initiations-C-Domänen bestätigt werden und deutet auf einen universellen Katalysemechanismus der Familie der C-Domänen hin. Die beiden untersuchten Systeme der Lipoinitiation der Surfactin- und CDA-Biosynthese zeigten jedoch auch Unterschiede. Während in der Surfactinsynthese eine durch Enzyme aus dem Primärmetabolismus CoA-aktivierte Fettsäure mit der Peptidyl-Carrier-Protein(PCP)-gebundenen Aminosäure kondensiert wird, wird die Fettsäure in der CDA-Biosynthese von einem Acyl-Carrier-Protein ausgehend übertragen. In beiden Reaktionen zeigten sich ausgeprägte Spezifitäten mit Ausnahme der Selektivität für die PCP-Domäne, die in beiden Systemen durch fremde PCP-Domänen substituiert werden konnte. Der zweite Teil der Arbeit bestand aus der Charakterisierung der eng mit C-Domänen verwandten Zyklisierungs-Domäne aus der Bacitracin-Synthetase BacA-Cy2. Diese katalysiert die Bildung des Thiazolinrings in dem Antibiotikum Bacitracin aus *Bacillus licheniformis* und wurde in dieser Arbeit ebenfalls als freistehendes Protein heterolog produziert, wodurch eine genaue Charakterisierung und Bestimmung der ausgeprägten Substratspezifität ermöglicht wurde.

Summary

Nonribosomally synthesized lipopeptides of microbial origin contain a fatty acyl moiety and exhibit diverse biological activities including antibiotic, anticancer or biosurfactant properties. Thus, these natural products are subject of intense research and present a potent class of new agents for pharmaceutical and biotechnological applications. The biosynthesis of lipopeptides usually starts by *N*-acylation of the peptide backbone and is referred to as lipoinitiation.

This study addresses the exploration and characterization of different mechanisms of lipoinitiation consisting of activation and transfer of the lipid moiety. These reactions were elucidated during the biosynthesis of the lipopeptide surfactin from *Bacillus subtilis* and of the acidic lipodepsipeptide CDA (calcium-dependent antibiotic) from *Streptomyces coelicolor* A3(2) displaying two novel strategies for the incorporation of a fatty acid into a peptidic natural product. The involved domains were dissected from their nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) by genetic techniques and were heterologously produced as singular proteins. Commercially not available substrates were chemically synthesized. Biochemical studies revealed in both systems that the starter C domains from the initiation modules of the corresponding NRPSs are essential for the transfer of the fatty acid acting as acyltransferases. The catalytic motif HHxxxDG identified in other C domains was shown to be indispensable in this reaction which was investigated by mutational studies pointing towards a common mechanism of C domain catalyzed reactions. The investigated lipoinitiation reactions during surfactin and CDA biosynthesis differed in the mode of fatty acid activation. For surfactin production, enzymes from the primary metabolic pathways activate the fatty acid by coupling it to coenzyme A resulting in a reactive thioester that directly serves as a substrate for the *N*-acylation of the peptidyl-carrier protein(PCP)-bound amino acid. However, the starter C domain from the CDA synthetase needs an acyl-carrier protein(ACP)-bound fatty acid for the transfer reaction. Both starter C domains exhibit high selectivities for their substrates except for the PCP domain, which could be arbitrarily substituted with other PCP domains.

The second part of the thesis aimed at the characterization of a cyclization domain of the bacitracin synthetase BacA-Cy2 which is closely related to C domains. It catalyzes the formation of a thiazoline in the antibiotic bacitracin from *Bacillus licheniformis* and was dissected from the native synthetase resulting in a singular protein to allow detailed characterization and the determination of substrate specificity.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Nichtribosomale Peptidsynthese	3
1.1.1 Essentielle Domänen	4
1.1.1.1 Die Adenylierungs(A)-Domäne	5
1.1.1.2 Thiolierungs(T)-Domäne	7
1.1.1.3 Kondensations(C)-Domäne	9
1.1.1.4 Thioesterase(TE)-Domänen	13
1.1.2 Externe Thioesterasen des Typs II	15
1.1.3 <i>In cis</i> agierende, optionale Domänen und <i>in trans</i> agierende Modifikationsenzyme	17
1.1.3.1 Epimerisierung	17
1.1.3.2 Heterozyklisierung, Oxidations- und Reduktionsreaktionen	18
1.1.3.3 Methylierungen	20
1.1.3.4 Formylierungen	20
1.1.3.5 Weitere Modifikationen	20
1.1.4 Einblick in ein Terminationsmodul und NRPS-Interaktionen	21
1.2 Nichtribosomal synthetisierte Lipopeptide	22
1.2.1 Das Lipoheptapeptid Surfactin	24
1.2.2 Das saure Lipodepsi-peptid CDA	26
1.2.3 Bacitracin	29
1.3 Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL)	30
2 Aufgabenstellung	32
3 Verwendete Materialien	33
3.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	33
3.2 Verwendete Geräte	34
3.3 Verwendete Software und Online-Tools	35
3.4 Kulturmedien	36
3.4.1 LB-Medium	36
3.4.2 Difco-Sporulations(DSM)-Medium	36
3.4.3 2YT-Medium	37

3.4.4 High salt- und Low salt-Medium.....	37
3.4.5 Chromazurolsulfonat(CAS)-Agarmedium.....	38
3.4.6 SpIII-Medium.....	38
3.5 Verwendete Mikroorganismen.....	39
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	39
3.5.2 <i>Escherichia coli</i> 10-beta.....	39
3.5.3 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	39
3.5.4 <i>Bacillus subtilis</i> MR168.....	40
3.5.5 <i>Bacillus subtilis</i> OKB105.....	40
3.6 Die verwendeten Vektorsysteme pET28a(+) und pCB28a(+)......	41
3.7 Oligonukleotide.....	41
4 Methoden.....	44
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	44
4.1.1 Anzucht von Mikroorganismen.....	44
4.1.2 Präparation genomischer DNA.....	44
4.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
4.1.4 Konstruktion der rekombinanten Expressionsplasmide.....	45
4.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese.....	46
4.1.6 Deletionsmutanten in <i>Bacillus subtilis</i>	47
4.2 Proteinchemische Methoden.....	48
4.2.1 Heterologe Genexpression.....	48
4.2.2 Zellaufschluss.....	48
4.2.3 Proteinreinigung über Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC).....	49
4.2.4 Proteinreinigung über Größenausschlusschromatographie.....	49
4.2.5 Proteinentsalzung über Hi-Trap™-Entsalzungssäulen.....	50
4.2.6 Photometrische Protein-Nachweise.....	50
4.2.6.1 Qualitativer Nachweis mittels Bradford-Test.....	50
4.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Absorption bei 280 nm.....	50
4.2.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung durch den Bicinchoninsäure-Assay.....	51
4.3 Analytische Methoden.....	51
4.3.1 Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	51
4.3.2 Peptidmassen-Fingerabdruck.....	52

4.3.3 HPLC-MS.....	52
4.4 Extraktion von Surfactin.....	53
4.5 Chemische Synthesen.....	53
4.5.1 Synthese von Aminoacyl-CoA-Derivaten.....	53
4.5.2 Synthese von Acyl-CoA-Derivaten.....	54
4.5.2.1 Synthese von 3-Hydroxymyristinsäure-CoA.....	54
4.5.2.2 Synthese von Hexanoyl- und 2-Hexenoyl-CoA.....	55
4.5.3 Synthese von Amino-CoA.....	56
4.5.4 Synthese von Ser-NHCoA.....	59
4.6 Biochemische Untersuchungen.....	60
4.6.1 Aktivierungsassays von 3-Hydroxyfettsäuren durch Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL) aus <i>B. subtilis</i>	60
4.6.2 Assays zur Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion der Surfactinbiosynthese.....	60
4.6.2.1 Beladung von SrfAA-PCP1.....	60
4.6.2.2 Kondensationsassay mit SrfAA-C1.....	61
4.6.3 Alkalische Spaltung von Substrat-PCP-Thioesterbindungen durch KOH.....	61
4.6.4 Präparative Beladung von Carrier Proteinen (CP).....	62
4.6.5 Assays zur Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion der CDA-Biosynthese.....	62
4.6.5.1 Beladung der Carrier Proteine für die Lipoinitiation von CDA.....	62
4.6.5.2 Kondensationsassay mit Cda-C1.....	63
4.6.6 Assays zur Untersuchung von BacA-Cy2.....	63
5 Ergebnisse.....	65
5.1 Lipoinitiation in der Surfactin-Biosynthese.....	65
5.1.1 Heterologe Expression und Reinigung von <i>lcfA</i> , <i>yhfL</i> , <i>yhfT</i> , <i>yngI</i> , <i>srf-TEII</i> , <i>srfAA-M1</i> , <i>srfAA-C1</i> und <i>srfAA-PCP1</i>	65
5.1.2 Fettsäureaktivierung durch die FACL LcfA, YhfL, YhfT und YngI.....	66
5.1.3 Surfactin-Produktion in FACL-Deletionsmutanten von <i>B. subtilis</i>	68
5.1.4 Transfer der aktivierten Fettsäure durch Katalyse von SrfAA-C1.....	71
5.1.4.1 Untersuchungen der Lipoinitiationsreaktion mit dem Modul SrfAA-M1.....	71
5.1.4.2 Untersuchungen der Lipoinitiationsreaktion mit der Inititations-C-Domäne SrfAA-C1.....	72
5.1.5 Untersuchung der SrfAA-C1 Varianten.....	75

5.2 Lipoinitiation in der CDA-Biosynthese	76
5.2.1 Heterologe Expression und Reinigung von <i>cda-ACP</i> , <i>cda-C1</i> , <i>dptA-PCP1</i> , <i>hxcO</i> und <i>hcmO</i>	78
5.2.2 Darstellung von 2,3-Epoxyhexanoyl- <i>S</i> -ACP und Ser- <i>S</i> -PCP	78
5.2.3 Transfer von 2,3-Epoxyhexanoyl- <i>S</i> -ACP durch Katalyse von Cda-C1	82
5.2.4 Untersuchung der Varianten von Cda-C1	85
5.3 Untersuchungen der artifiziell singulären Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2	86
5.3.1 Heterologe Expression und Reinigung von <i>bacA-PCP1</i> , <i>bacA-APCP2</i> und <i>bacA-Cy2</i>	86
5.3.2 Untersuchung der Zyklisierungsreaktion durch BacA-Cy2	87
6 Diskussion	90
6.1 Aufklärung der Lipoinitiation in der Surfactin-Biosynthese	90
6.1.1 Fettsäureaktivierung durch in trans wirkende Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen	90
6.1.2 Fettsäuretransfer durch Katalyse der Initiations-C-Domäne SrfAA-C1	93
6.1.3 Vorschlag für den Lipoinitiationsmechanismus in der Biosynthese von Surfactin	99
6.2 Aufklärung der Lipoinitiationsreaktion in der CDA-Biosynthese	100
6.2.1 Herstellung der Substrate Aminoacyl- <i>S</i> -PCP und Acyl- <i>S</i> -ACP	101
6.2.2 Lipoinitiationsreaktion durch Katalyse von Cda-C1	102
6.2.3 Vorschlag für den Lipoinitiationsmechanismus in der Biosynthese von CDA	106
6.3 Unterschiedliche Strategien der Lipoinitiation in der Naturstoffsynthese	107
6.4 Untersuchung der artifiziell singulären Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2	110
6.5 C-Domänen und verwandte Domänen in der nichtribosomalen Peptidsynthese	111
7 Ausblick	114
7.1 Perspektiven nach Klärung der Lipoinitiationsmechanismen in CDA und Surfactin	114
7.2 Zyklisierungsreaktion während der Biosynthese von Bacitracin	116
8 Literaturverzeichnis	117
9 Anhang	131
9.1 Abkürzungsverzeichnis	131
9.1.1 allgemeine Abkürzungen	131
9.1.2 Abkürzungen von proteinogenen Aminosäuren	133
9.2 Kernmotive der essentiellen NRPS-Domänen	134
9.3 Identifikationsnummer der verwendeten Gene	135

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat die Aufklärung von Naturstoffbiosynthesemechanismen in Mikroorganismen an Bedeutung gewonnen und ist Gegenstand intensiver Forschung. Die Entdeckung vieler Naturstoffe war ein wichtiger Schritt in der Behandlung von verschiedensten Krankheiten.¹ So wird z. B. das 1928 von Alexander Fleming entdeckte β -Lactam-Antibiotikum Penicillin bis heute zur Therapie von bakteriellen Erkrankungen verwendet.² Durch die Sequenzierung unzähliger bakterieller Genome mit Hilfe moderner und kosteneffizienter Sequenzierungstechnologien und durch die Entwicklung bioinformatischer Programme zur Analyse der Genome ist die Anzahl bekannter und putativer Naturstoffe rapide gestiegen und bis zu 10% der bakteriellen und fungalen Genome werden der Produktion von Sekundärmetaboliten zugeordnet.³⁻⁵ Viele dieser Naturstoffe weisen großes Potential zur Anwendung in pharmazeutischen und biotechnologischen Bereichen auf, da die Aktivität dieser Biomoleküle sich durch eine enorme Vielfalt von antimikrobieller über immunosuppressiver bis antitumoraler Natur auszeichnet.⁶ Die natürliche Funktion antibakterieller Sekundärmetabolite ist vermutlich eher von anderer Bedeutung aufgrund von Konzentrationen im subinhibitorischen Bereich nach Sekretion ins extrazelluläre Medium. Für viele Antibiotika konnte in natürlichen Systemen der Produzentenstämme eine Beteiligung in Zell-Zell-Kommunikationswegen wie z.B. Quorum Sensing oder in der Formation eines Biofilms zur Bildung einer immobilen, sesshaften Kolonie gezeigt werden.⁷ Nichtsdestotrotz bilden Naturstoffe eine wichtige Quelle für neue Wirkstoffe, wie auch die Daten der U.S. Food and Drug Administration (FDA) belegen, in denen 39% aller zugelassenen Medikamente als Naturstoffe, chemisch synthetisierte Naturstoffe oder als direkte Derivate von diesen aufgeführt werden.¹

Ein großer Nachteil der breiten Anwendung von Antibiotika ist die schnelle Ausbildung von Resistenzen vieler pathogener Stämme, die eine Behandlung mit konventionellen Antibiotika erschweren.⁸ Besonders die Bildung von resistenten Gram-positiven Bakterien wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder *Enterococci* Spezies, die gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin resistent sind (VRE), unterstreichen die Notwendigkeit zur stetigen Weiterentwicklung und Neuentdeckung von pharmazeutisch anwendbaren Antibiotika sowie die Erprobung neuartiger Anwendungsstrategien.⁹⁻¹⁰ Besonders für die Weiterentwicklung z.B. durch genetische Manipulation ist die Kenntnis der an der Biosynthese beteiligten Faktoren und deren der Synthese zugrunde liegenden Mechanismen notwendig. Die Naturstoffe werden

templat- oder nichttemplatdirektioniert entweder ribosomal, wie z.B. im Fall von Patellamid oder Capistrin, oder nichtribosomal wie z.B. durch Polyketidsynthese oder nichtribosomaler Peptidsynthese assembliert.¹¹⁻¹³ Ein großer Teil der nichtribosomal synthetisierten Sekundärmetabolite ist peptidischer Herkunft und werden häufig durch Multienzymkomplexe, den sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), assembliert. Diese Enzyme dienen gleichzeitig als Templat und als Katalysezentrum für die Synthese des Naturstoffs und besitzen einen modularen Aufbau, in dem jedes Modul für den Einbau eines Monomers in die wachsende Peptidkette verantwortlich ist. Die Erkennung, Aktivierung und der Einbau von über 500 bisher bekannten Monomeren, die also nicht nur auf die proteinogenen Aminosäuren beschränkt sind, sowie die Beteiligung von modifizierenden Domänen und Enzymen ermöglicht eine bemerkenswerte strukturelle Vielfalt der durch NRPS-Systeme synthetisierten Peptide (Abb. 1.1) und erklärt deren verschiedenartige Bioaktivitäten.¹⁴⁻¹⁵

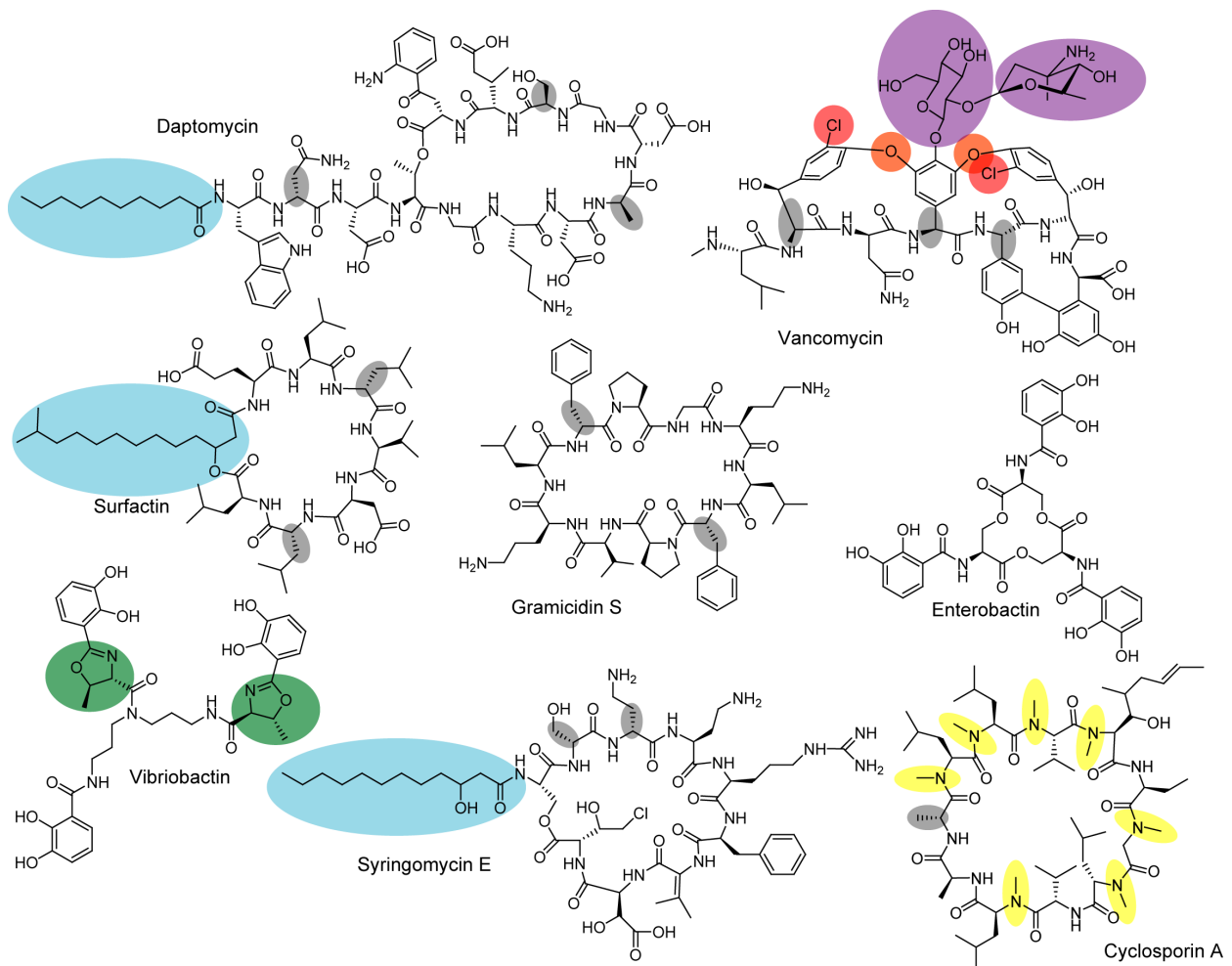


Abb. 1.1: Verdeutlichung der Strukturdiversität an einigen Beispielen von nichtribosomal synthetisierten Peptiden. Strukturelle Besonderheiten wie Fettsäuren (blau), Glykosylreste (violett), Heterozyklen (grün), Halogenierungen (rot), Etherbindungen (orange), D-Aminosäuren (grau) und N-Methylierungen (gelb) sind farblich hervorgehoben.

Häufig vorkommende Makrozyklisierung sowie der Einbau von D-konfigurierten Aminosäuren verleiht den Peptiden besondere Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau und strukturelle Rigidität, die für die Aktivität von großer Bedeutung sein kann.

Durch die biochemische und strukturelle Charakterisierung der NRPS konnte ein detaillierter Einblick in den Ablauf und die Mechanismen der nichtribosomalen Peptidsynthese gewonnen werden, der in den folgenden Abschnitten der Einleitung vorgestellt wird. Anschließend werden die in dieser Arbeit behandelten nichtribosomal synthetisierten Naturstoffe eingehend beschrieben.

1.1 Nichtribosomale Peptidsynthese

Nichtribosomal synthetisierte Peptide können durch eine einzelne NRPS assembliert werden (Typ I), die alle Module für die Synthese auf einer Polypeptidkette enthält, wie es häufig in fungalen Systemen der Fall ist, oder durch mehrere, miteinander wechselwirkende NRPS (Typ II); dieser Fall wird häufiger in bakteriellen Systemen beobachtet.¹⁵ Desweiteren können NRPS durch die Abfolge der Module während der Synthese in drei Klassen unterteilt werden¹⁶: In einer linearen NRPS (Typ A) entspricht die Abfolge der Module vom N- zum C-Terminus exakt der Reihenfolge der Monomere im späteren Peptid, so dass während der Synthese das wachsende Peptid linear von einem Modul zum nächsten weitergeleitet wird. Beispiele für Naturstoffe aus dieser Art von NRPS-Systemen sind die Lipopeptide Surfactin und Daptomycin oder das Antibiotikum Tyrocidin.¹⁷⁻¹⁹ In iterativen NRPS (Typ B) werden die Module während der Synthese des Peptids mehrfach genutzt, sind aber auch linear wie in Typ A angeordnet. Hierdurch entstehen Peptide mit sich wiederholenden Untereinheiten, wie das Siderophor Enterobactin aus 2,3-Dihydroxybenzoylserin-Einheiten, das Chromodepsipeptid Thiocoralin oder das Antibiotikum Gramacidin S.²⁰⁻²² Typ C, die nichtlinearen NRPS, beschreiben einen modularen Aufbau, aus dem sich die Aminosäureabfolge des Naturstoffs nicht ablesen lässt. Die Reihenfolge der Domänen innerhalb eines Moduls weicht häufig von denen des Typs A und B ab. Eine Vorhersage der Struktur des Produkts ist bei diesen Systemen nur bedingt möglich. Das Siderophor Vibriobactin und das Lipopeptid Syringomycin sind Beispiele für nicht-lineare nichtribosomal assemblierte Peptide.²³⁻²⁴

1.1.1 Essentielle Domänen

Für den Einbau eines Monomers in die wachsende Peptidkette sind mindestens drei Domänen notwendig, die ein Standardmodul einer NRPS bilden. Die Adenylierungs(A)-Domäne, die Monomerbausteine selektiv erkennt, aktiviert und auf die Carrier-Domäne, die sogenannte Thiolierungs(T)- oder auch Peptidyl-Carrier-Protein(PCP)-Domäne, überträgt, wodurch eine kovalente Bindung des Reaktionsintermediats über einen 4'-Phosphopantethein(Ppant)-Rest an das Katalyseenzym entsteht (Abb. 1.2). Die Verknüpfung zweier dieser kovalent gebundener Bausteine erfolgt durch die Kondensations(C)-Domäne, bei der das *downstream* gelegene Akzeptorsubstrat kovalent gebunden bleibt und das Donorsubstrat durch nukleophilen Angriff auf den Thioester übertragen wird.²⁵ Dabei gewährleistet die kovalente Bindung der Substrate auf dem etwa 20 Å langen 4'-Ppant-Arm die nötige Beweglichkeit, um die katalytischen Zentren der benachbarten Domänen zu erreichen und ermöglicht gleichzeitig den zeitlich korrekten Ablauf der Synthese. Zudem können die Substrate so vor Nebenreaktionen mit freien Molekülen wie z.B. der Hydrolyse geschützt werden. Durch den Ablauf dieser Reaktionen an mehreren, aufeinanderfolgenden Modulen wird das Peptid fließbandartig assembliert, bis schließlich die Produktfreisetzung durch die letzte Domäne im Terminationsmodul erfolgt. In vielen Fällen ist dies eine Thioesterase(TE)-Domäne, die das Produkt durch Makrozyklisierung freisetzt.

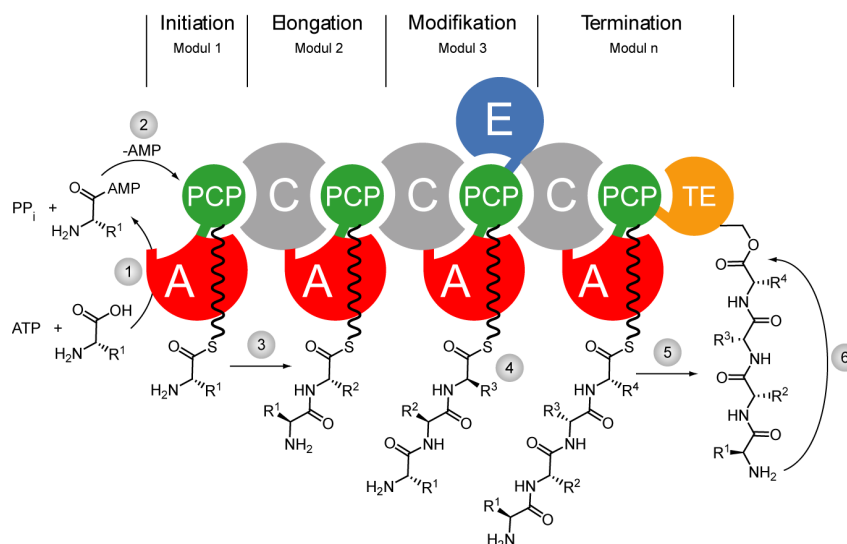


Abb. 1.2: Prinzip der nichtribosomalen Peptidsynthese. Zunächst erfolgt die Aktivierung (1) und Übertragung des Monomers (2) auf die PCP-Domäne (grün) durch Katalyse der A-Domäne (rot). Die Verknüpfung zweier Bausteine (3) wird durch die C-Domäne (grau) katalysiert. Modifizierungen wie Epimerisierungen (4) können durch optionale Domänen *in cis* erfolgen. Zur Produktfreisetzung wird das Peptid auf die TE-Domäne (orange) übertragen (5) und dort durch Makrozyklisierung (6) abgespalten. Der Phosphopantetheinyl-Kofaktor der PCP-Domäne ist nur schematisch angedeutet. Der hier verwendete Farbcode der Domänen wird in der weiteren Arbeit beibehalten.

1.1.1.1 Die Adenylierungs(A)-Domäne

Die Erkennung und Aktivierung eines Monomers erfolgt selektiv durch die A-Domäne, wodurch die Primärstruktur des Peptids festgelegt wird.²⁶ Die A-Domänen gehören zu der ANL-Superfamilie, denen auch die Acyl-CoA-Synthetasen und Luciferasen angehören²⁷, und katalysieren zwei Teilreaktionen: Zunächst wird das Substrat Mg^{2+} - und ATP-abhängig adenyliert (Abb. 1.3) und anschließend durch Verknüpfung mit dem 4'-Ppant-Rest der *downstream* gelegenen PCP-Domäne thioliert.²⁸

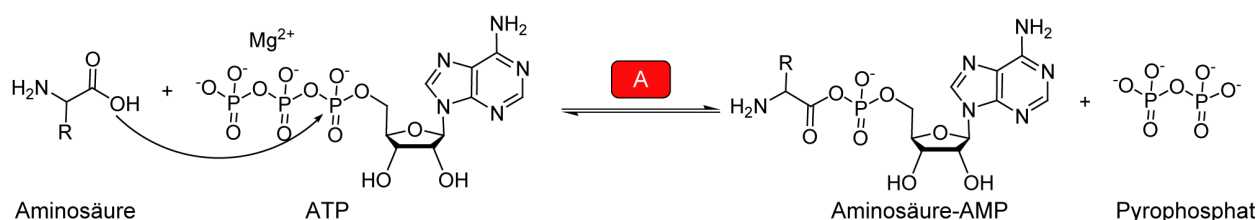


Abb. 1.3: Reversible Adenylierungsreaktion. Diese A-Domänen katalysierte Reaktion fungiert als Erkennung und Aktivierung des Monomers.

Die Adenylierung ist eine Gleichgewichtsreaktion, bei der anorganisches Pyrophosphat entsteht. Durch anschließende Hydrolyse wird daraus das thermodynamisch stabilere Orthophosphat gebildet, wodurch das Gleichgewicht der Reaktion noch weiter auf die Seite des Adenylierungsprodukts verschoben wird. Diese Reaktion ist ähnlich zu der Aktivierung der Aminosäuren in der Proteinsynthese, die durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen vermittelt wird.²⁹ Die beiden Enzymklassen weisen jedoch keine strukturellen oder sequenziellen Homologien auf.³⁰ Zudem gibt es in der nichtribosomalen Peptidsynthese keine Kontrollfunktion (*proof-reading*), wodurch in manchen Fällen verschiedene Monomere durch eine A-Domäne eingebaut werden können, was wiederum zur Herstellung einer Reihe von Naturstoffen durch ein einzelnes NRPS-System führt. Durch bioinformatische Sequenzvergleiche und Mutationsstudien konnten einige Kernmotive in der A-Domäne identifiziert werden, die unterschiedliche Funktionen übernehmen, die strukturelle Stabilisierung, Bindung der Substrate ATP, Mg^{2+} und der Aminosäure und katalytische Aufgaben umfassen (s. Anhang 9.2).³¹⁻³² Die Bindung der Aminosäure erfolgt durch einen konservierten Lysin- und einen Aspartatrest, welche die Carboxy- bzw. die Aminogruppe der Aminosäure koordinieren. Weitere acht Reste, die als „nicht-ribosomaler Code“ der Substraterkennung in der nichtribosomalen Peptidsynthese bezeichnet werden, sind an der Ausbildung der Spezifität für die Seitenkette beteiligt und können für die Vorhersage des Substrats der A-Domäne herangezogen werden, was besonders in Genome Mining Strategien Verwendung

findet.³²⁻³⁴ Der Code kann auch für Strategien für das rationale Design neuer Naturstoffe verwendet werden, denn durch gezielte Mutagenese der beteiligten Aminosäuren oder durch gerichtete Evolution des an der Substraterkennung beteiligten Bereichs kann die Spezifität verändert werden, wie in einigen Beispielen an A-Domänen der Surfactin- oder Tyrocidin-Synthetasen bereits gezeigt wurde.^{31,35}

Durch Kristallstrukturanalysen gelang es, die Struktur der A-Domäne PheA aus der Gramicidin S NRPS zu lösen.³⁶ Dabei zeigte sich, dass die A-Domäne aus zwei Untereinheiten besteht: der Core-Domäne, die etwa 450 Aminosäuren umfasst und der Subdomäne aus etwa 100 Aminosäuren (Abb. 1.4). Die beiden Regionen sind durch eine sogenannte *hinge*-Region verbunden, die eine gewisse Beweglichkeit der Domänen zueinander erlaubt. Zu Beginn eines Katalysezyklus nimmt die A-Domäne eine offene Konformation ein, in der die Aminosäure und ATP binden können. Nach der Adenylierungsreaktion erfolgt eine strukturelle Umorganisation der beiden Regionen und bilden eine geschlossene Konformation mit einem Kanal für den 4'-Ppant-Rest, um die kontrollierte Thiolierungsreaktion zu erlauben und das Adenylat vor Hydrolyse zu schützen.²⁷ Nach der Thiolierung wird wieder die offene Konformation gebildet, die Produkte werden freigesetzt und ein neuer Katalysezyklus kann eingeleitet werden.

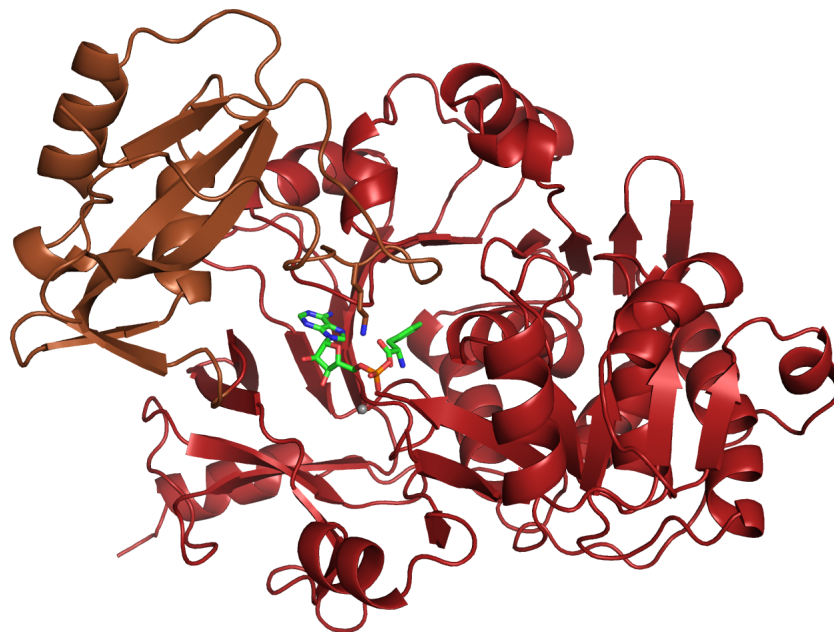


Abb. 1.4: Cartoon-Darstellung der Struktur der A-Domäne PheA (PDB-Code: 1AMU). Die Core-Domäne ist in rot, die Sub-Domäne in braun dargestellt. Die Seitenkette des konservierten Lysin-Rest (L517) ist dargestellt, die Liganden AMP und Phenylalanin sind in grün gezeigt.

In manchen NRPS-Genclustern sind kleine, etwa 70 Aminosäuren lange Proteine kodiert, die aufgrund ihrer Homologie zu MbtH aus dem biosynthetischen Gencluster von Mycobactin MbtH-ähnliche Proteine genannt werden.³⁷ Diese Proteine assoziieren mit A-Domänen und scheinen wichtig für die Aktivität einiger A-Domänen aus demselben Cluster zu sein.³⁸ Die A-Domänen aus VbsS (Vicibactin-Biosynthese), CmnO (Capreomycin-Biosynthese) oder VioO (Viomycin-Biosynthese) zeigten nur in Anwesenheit der kognaten MbtH-ähnlichen Proteine aus dem jeweiligen Gencluster Adenylierungsaktivität.³⁹⁻⁴⁰ Die starke Interaktion dieser beiden Proteine konnte auch durch Co-Elution während der Reinigung gezeigt werden. Für die heterologe Produktion des Initiationsmoduls der Glidobactin-Synthetase GlbF konnte ein lösliches Expressionsprodukt nur bei Co-Expression des MbtH-ähnlichen Proteins GlbE beobachtet werden.⁴¹ Die exakte Funktion dieser Proteine ist noch nicht geklärt. Die erwähnten Arbeiten zeigen aber ihre Bedeutung für *in vitro* Studien an einigen A-Domänen und deuten auf ihr Anwendungspotential im rationalen Design neuer Naturstoffe durch den Austausch von A-Domänen oder ganzen Modulen unter Erhaltung der Aktivität hin.

1.1.1.2 Thiolierungs(T)-Domäne

Die Thiolierungs(T)-Domäne ist für die kovalente Bindung der Reaktionsintermediate während der Peptidsynthese verantwortlich und wird deswegen auch häufig Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) genannt und schließt sich in der Regel C-terminal an eine A-Domäne an.⁴²⁻⁴³ Die etwa 80-100 Aminosäuren umfassende PCP-Domäne gewährleistet die Translokation des Substrats zwischen den verschiedenen Katalysezentren, die in der nichtribosomalen Peptidsynthese beteiligt sind. Die Bindung der Intermediate erfolgt dabei über einen Thioester mit dem kovalent gebundenen Kofaktor 4'-Phosphopantethein, der zuvor auf die PCP-Domäne übertragen wird. Diese posttranslationale Modifikation von der *apo*- zur *holo*-Form der PCP-Domäne wird auch *priming* genannt und von 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen) katalysiert.⁴⁴ Die Bindungsstelle für die prosthetische Gruppe ist die Seitenkette eines hochkonservierten Serins in dem für PCP-Domänen charakteristischen Kernmotiv GGxS.⁴⁵ Die Übertragung des Ppant-Rests erfolgt in einer Mg^{2+} -abhängigen Reaktion durch Angriff der Hydroxylgruppe des Serinrests auf die β -Phosphatgruppe von Coenzym A, wobei 3',5'-Adenosindiphosphat (3',5'-ADP) freigesetzt wird (Abb. 1.5).^{44,46} Die Struktur der PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis* zeigte einen bis dahin unbekannten Faltungstyp, in dem die Phosphatgruppen von Coenzym A von vier Aminosäureresten im

katalytischen Zentrum und einem Mg^{2+} -Ion koordiniert werden, das ebenfalls in der aktiven Tasche durch drei saure Reste gebunden ist.⁴⁷⁻⁴⁸ Bemerkenswert daran ist, dass der Ppant-Rest von Coenzym A offensichtlich nicht an der Bindung mit Sfp beteiligt ist, wodurch die äußerst relaxierte Substratspezifität von Sfp erklärt werden kann. Da Sfp auch dem Carrier-Protein gegenüber eine relaxierte Substratspezifität aufweist,⁴⁹ findet es als wichtiges Werkzeug in der Manipulation und Beladung von PCP-Domänen Anwendung.⁵⁰

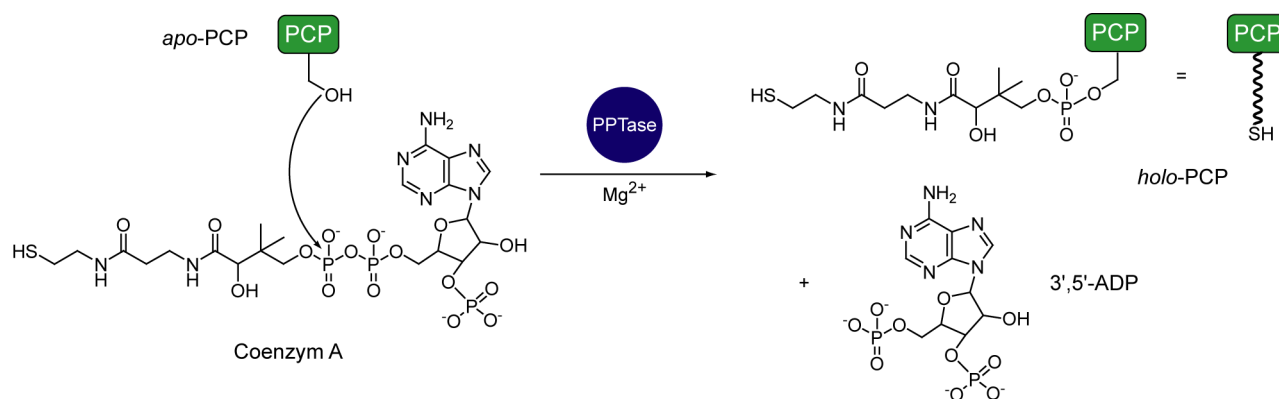


Abb. 1.5: *Priming* der PCP-Domäne. Die PPTase katalysiert in einer Mg^{2+} -abhängigen Reaktion den nukleophilen Angriff der Serinseitenkette auf die β -Phosphatgruppe von Coenzym A.

Die kovalente Bindung des Substrats während der Synthese bietet einige Vorteile. Durch gerichtete Translokation werden die freie Diffusion der Substrate und unerwünschte Nebenreaktionen unterdrückt und somit die Effizienz der Synthese gesteigert.⁵¹ Die Verwendung eines Thioesters konserviert die Energie des vorhergehenden Adenylats und bleibt somit eine reaktive Zwischenstufe, die als gutes Acylierungsmittel einen schnellen nukleophilen Angriff erleichtert. Das Auftreten von Carrier-Proteinen in komplexen Biosynthesewegen ist nicht nur in NRPS-Systemen zu finden, auch in der Fettsäure-Synthase und in Polyketidsynthasen kommen Acyl-Carrier-Proteine (ACP) zum Einsatz, die PCP-Domänen nicht nur in ihrer Funktion als Transportmittel der Synthese-Intermediate ähneln, sondern auch in der Faltung.⁵²⁻⁵³

Die Struktur von PCP-Domänen kann als vier Helix-Bündel beschrieben werden.⁵⁴ NMR-Studien der PCP-Domäne TycC3-PCP aus der Tyrocidin-Synthetase enthüllten drei unterscheidbare Konformationen der PCP-Domäne, die als A-, A/H, und H-Zustand bezeichnet wurden (Abb. 1.6).⁵⁵ In der *apo*-Form liegt die T-Domäne in einem Gleichgewicht zwischen dem A- und A/H-Zustand vor, während in der *holo*-Form der H- und A/H-Zustand koexistieren. Während die Loop-Region zwischen der Helix I und II im A/H-Zustand am geringsten ist und somit die kompakteste Struktur darstellt, ist diese Loop-Region im A- und H-Zustand größer und die Struktur damit relaxierter. Der

A- und H-Zustand unterscheiden sich hauptsächlich durch die Orientierung der Helix I und II zueinander.

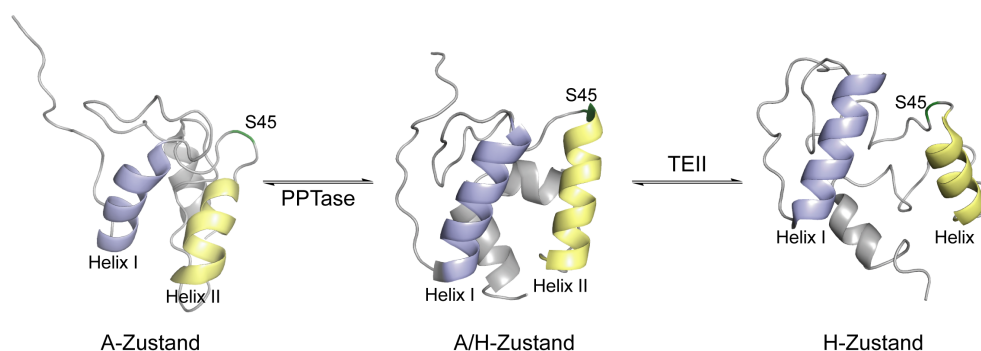


Abb. 1.6: Die verschiedenen Konformationen der PCP-Domäne TycC3-PCP. Der A/H-Zustand (PDB-Code: 2GDW) ist die gemeinsame Konformation der *apo*- und *holo*-Form der PCP-Domäne. Die A-Konformation (PDB-Code: 2GDY) ist nur für die *apo*-PCP zu beobachten und ist der einzige Zustand, mit der eine PPTase wechselwirkt; wohingegen die H-Konformation (PDB-Code: 2GDX) nur von der *holo*-PCP eingenommen wird und die mit externen Thioesterasen des Typs II wechselwirkende Form ist. Der Ppant-tragende Serinrest ist in grün hervorgehoben.

Beim Übergang vom H- in den A/H-Zustand ändert ein Ppant-Arm, gebunden an den konservierten Serinrest des Kernmotivs, seine relative Position an der Proteinoberfläche um über 100°, wodurch das *swinging-arm*-Modell der Translokation durch die PCP-Domäne bestätigt werden konnte. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass PPTasen wie Sfp nur im A-Zustand mit PCP-Domänen interagieren, während externe Thioesterasen, die für die Reparatur von misacylierten PCP-Domänen zuständig sind (s. 1.1.2), ausschließlich mit dem H-Zustand wechselwirken.⁵⁶

1.1.1.3 Kondensations(C)-Domäne

Zur Komplettierung eines vollständig funktionalen Moduls zur Elongation des Peptids ist neben der A- und PCP-Domäne eine Kondensations(C)-Domäne nötig, da diese die Peptidbindungsknüpfung und somit den eigentlichen Elongationsschritt katalysiert.⁵⁷⁻⁵⁸ C-Domänen umfassen ungefähr 450 Aminosäuren und befinden sich in der Regel zwischen zwei A-PCP-Einheiten, also am C-terminalen Ende der ersten A-PCP- und vor dem N-Terminus der zweiten A-PCP-Einheit. Es sind jedoch auch freistehende C-Domänen bekannt, die durch Domänen-Interaktion Kondensationsreaktionen katalysieren.⁵⁹⁻⁶⁰ Die Reaktion verläuft unidirektional zwischen dem nukleophilen Aminoacyl-S-PCP_{downstream} und dem elektrophilen Peptidyl-S-PCP_{upstream} (Abb. 1.7). Dabei erfolgt der Angriff der α -Aminogruppe des Aminoacylrests auf die Thioesterbindung

zwischen dem Peptidylrest und der PCP-Domäne.⁵⁸ Das um eine Aminosäure elongierte Produkt verbleibt also auf der *downstream* gelegenen PCP-Domäne, während die *upstream* gelegene PCP-Domäne als *holo*-Form erneut mit einer Aminosäure durch die A-Domäne beladen werden kann. Das elongierte Peptidyl-S-PCP_{downstream} kann nun zum nächsten Katalysezentrum transportiert werden, das entweder die darauffolgende C-Domäne für einen weiteren Elongationsschritt sein kann, eine Modifikationsdomäne (s. 1.1.3) oder eine Thioesterasedomäne für die Freisetzung des Peptids (s. 1.1.1.4).

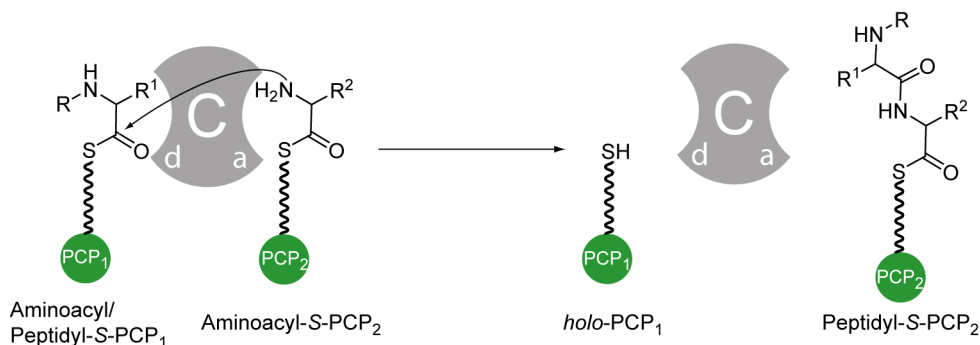


Abb. 1.7: Peptidbindungs-knüpfung durch C-Domänen-Katalyse. Die PCP-gebundene Substrate binden an der Donor(d)- und Akzeptor(a)-Seite, anschließend erfolgt der Angriff der Aminogruppe des Nukleophils auf die Thioesterbindung des Elektrophils. Das elongierte Peptidyl-S-PCP kann nun zu einem weiteren Katalysezentrum geleitet werden, die *holo*-PCP kann erneut durch die A-Domäne beladen werden.

Der Ablauf der Kondensationsreaktion legt nahe, dass die C-Domäne zwei Bindungsstellen für die beiden Substrate aufweist, die als Akzeptor- und Donorseite bezeichnet werden.⁶¹ Um eine Misinitiation der später folgenden Peptidbindungs-knüpfungen zu vermeiden, ist vermutlich eine hohe Affinität der C-Domäne für das Akzeptorsubstrat zu finden, so dass diese Form in der C-Domäne gebunden bleibt, bis die Elongationsreaktion abgeschlossen ist.¹⁶ In der Tat konnten einige Studien eine hohe Spezifität der Akzeptorseite nachweisen, was dieses Modell unterstützt.^{42,61} Außerdem stellt die C-Domäne damit neben der A-Domäne ein zweites Zentrum für die Substratkontrolle dar. Die Donorseite der C-Domäne zeigte hingegen eine deutlich niedrigere Substratspezifität.⁶¹ Allerdings selektieren C-Domänen, die auf eine Epimerisierungs(E)-Domäne (s. 1.1.3.1) folgen, mit einer bemerkenswert hohen Rate zwischen D- und L-konfigurierten Aminosäuren und stellen somit einen Filter für die erfolgreich stereoinvertierte Aminosäure dar.⁶¹⁻⁶³ Man unterscheidet C-Domänen daher auch nach der Konfiguration der Substrate: C-Domänen, die zwei L-Aminosäuren kondensieren, werden als ^LC_L-Domänen bezeichnet, solche, die auf eine E-Domäne folgen und daher eine D-Aminosäure mit einer L-Aminosäure verknüpfen als

^DC_L-Domänen.⁶⁴

Durch Sequenzanalysen und Mutationsstudien konnten auch innerhalb von C-Domänen einige konservierte Kernmotive unterschiedlicher Funktion identifiziert werden (s. Anhang 9.2).^{57,64-65} Dabei stellte sich heraus, dass das sogenannte Histidin-Motiv HHxxxDG eine entscheidende Rolle in der Katalyse spielt und essentiell für die Peptidbindungsknüpfung ist.^{57,59} Durch die Strukturanalyse der alleinstehenden C-Domäne VibH aus dem Vibriobactin-Gencluster konnte das Akzeptor-/ Donorseiten-Modell mit dem katalytischen Histidin-Motiv bestätigt werden.⁵⁹ Die Faltung von VibH zeigt Ähnlichkeiten zu Chloramphenicol-Acetyltransferasen⁶⁶⁻⁶⁷ und stellt ein Pseudodimer aus einem N-terminalen und einem C-terminalen Bereich dar (Abb. 1.8).

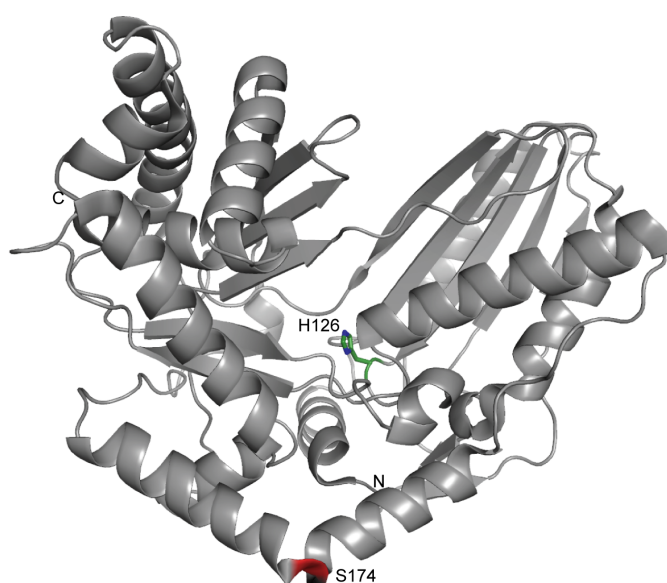


Abb. 1.8: Struktur der alleinstehenden C-Domäne VibH (PDB-Code 1L5A). Das katalytisch wichtige Histidin ist als Stabmodell in grün dargestellt, die *hinge*-Region in rot.

Die beiden Subdomänen bilden eine V-förmige Struktur, an deren Spitze (die sogenannte *hinge*-Region) ein konserviertes Serin die beiden Untereinheiten verbindet.⁵⁹ Dieser Aufbau bildet einen Solventkanal, in dessen Mitte sich das Histidin-Motiv befindet. Die PCP-Ppant-gebundenen Substrate treten höchstwahrscheinlich über die beiden Seiten dieses Kanals ein, der auch als „Canyon“ bezeichnet wird. Die später gelösten Strukturen der PCP-C-Bidomäne aus der Tyrocidin-Synthetase und des Terminationsmoduls SrfAC aus der Surfactin-Synthetase enthalten ebenfalls eine C-Domäne, deren Faltung und Positionierung des His-Motivs sehr ähnlich zu VibH ist.⁶⁸⁻⁶⁹

Die Funktionen der C-Domänen sind sehr vielfältig, neben der Kondensation zweier PCP-gebundenen Aminosäuren, sind auch C-Domänen mit einer davon abweichenden Reaktion

bekannt, die im folgenden kurz beschrieben werden. VibH z.B. katalysiert die Peptidbindungsbildung zwischen einem NRPS-gebundenen Dihydroxybenzoylrests und freiem Norspermidin und initiiert damit die Synthese des Siderophors.^{24,59} In der Synthese des Uridylpeptidantibiotikum Pacidamycin katalysiert eine freistehende C-Domäne die Freisetzung des Produktes durch Angriff eines freien Uridylderivats auf die PCP-gebundene Tetrapeptidkette.^{60,70} Desweiteren sind C-Domänen in bakteriellen und fungalen NRPS-Systemen bekannt, die eine Esterbindung ausbilden. Ein Beispiel ist die C-terminale C-Domäne aus CsaA in der Synthese von Cereulid, die den Angriff der Hydroxygruppe von D- α -Hydroxyisocapryl-D-alanyl-S-PCP auf die folgende PCP-gebundene L- α -Hydroxyisovaleryl-Einheit katalysiert.⁷¹ Auch in der Synthese des fungalen Fumosinin, ist die C-Domäne in Fum14p essentiell für die Ausbildung des für die toxische Wirkung wichtigen Esters zwischen einer Tricarballyl-Einheit und dem Fumosinin-Rückgrat.⁷² Auch SgcC5, eine freistehende C-Domäne aus dem Gencluster der Antibiotikum-Biosynthese C-1027, katalysiert eine Esterbindung zwischen einem Endiin-Kern, *in vitro* konnte jedoch auch die Bildung einer Amidbindung durch SgcC5 beobachtet werden.⁷³

Eine weitere Klasse der C-Domänen ist die der Initiations-C-Domänen, die im ersten Modul des NRPS-Systems zu finden ist. Die daraus resultierenden Naturstoffe enthalten in der Regel einen acylierten N-Terminus des Peptidrückgrats. Von Baltz *et al.* ist angenommen worden, dass der Acylrest ACP-gebunden als Substrat der Initiations-C-Domäne für die N-Acylierung dient.⁷⁴ Der Acylrest ist in den meisten Fällen ein Fettsäurerest, wodurch das Produkt zu den Lipopeptiden gezählt wird, ein aromatischer Rest wie in dem Siderophor Enterobactin oder eine Acteylgruppe, wie in dem Siderophor Erythrochelin.⁷⁵⁻⁷⁷ Phylogenetische Analysen ergaben, dass Initiations-C-Domänen eine eigene Gruppe unter den C-Domänen bilden und besonders die Kernmotive C2 und C4 schwächer konserviert sind als in den ^LC_L-Domänen, was vermutlich durch die wesentlich breitere Strukturvielfalt der durch Initiations-C-Domänen akzeptierten Substrate erklärt werden kann.⁶⁴

In allen verifizierten fungalen NRPS-Systemen, die ein makrozyklisches Peptid wie z.B. das Immunsuppressivum Cyclosporin herstellen, wurde eine C-terminale C-Domäne anstelle einer TE-Domäne gefunden.⁷⁸⁻⁸⁰ Dies legte die Vermutung nahe, dass die Makrozyklisierung in fungalen NRPS-Systemen von einer speziellen Klasse von C-Domänen (C_T) übernommen wird. Gao *et al.* konnten diese Vermutung kürzlich durch *in vitro* Studien der heterolog produzierten C-terminalen C-Domäne von TqaA für die Synthese des Alkaloids Tryptoquialanin bestätigen.⁷⁸

Neben den hier erwähnten Reaktionen durch C-Domänen gibt es noch einige andere Modifikationen

während der Peptidsynthese, die von optionalen Domänen katalysiert werden. Einige davon sind mit C-Domänen eng verwandt, wie die duale C/E-Domäne oder die Zyklisierungs(Cy)-Domäne. Diese werden trotz ihrer Verwandtschaft zu C-Domänen im nächsten Abschnitt der optionalen Domänen beschrieben.

1.1.1.4 Thioesterase(TE)-Domänen

Die Synthese eines Naturstoffs mit Hilfe einer NRPS-Maschinerie endet mit der Freisetzung des fertigen Produkts von der NRPS. In den meisten Fällen geschieht dies durch eine sogenannte Thioesterase(TE)-Domäne am C-Terminus des letzten Moduls (Terminationsmoduls).⁵¹ Für wenige Systeme ist die Freisetzung auch durch eine freistehende TE-Domäne postuliert, wie z.B. in der Biosynthese von Mannopectimycin oder Coelichelin.^{34,81} Die etwa 250-280 Aminosäuren lange TE-Domäne katalysiert die Freisetzung des Oligopeptids auf verschiedene Weisen, die Makrozyklisierung, Oligomerisierung oder Hydrolyse umfassen (Abb. 1.9).

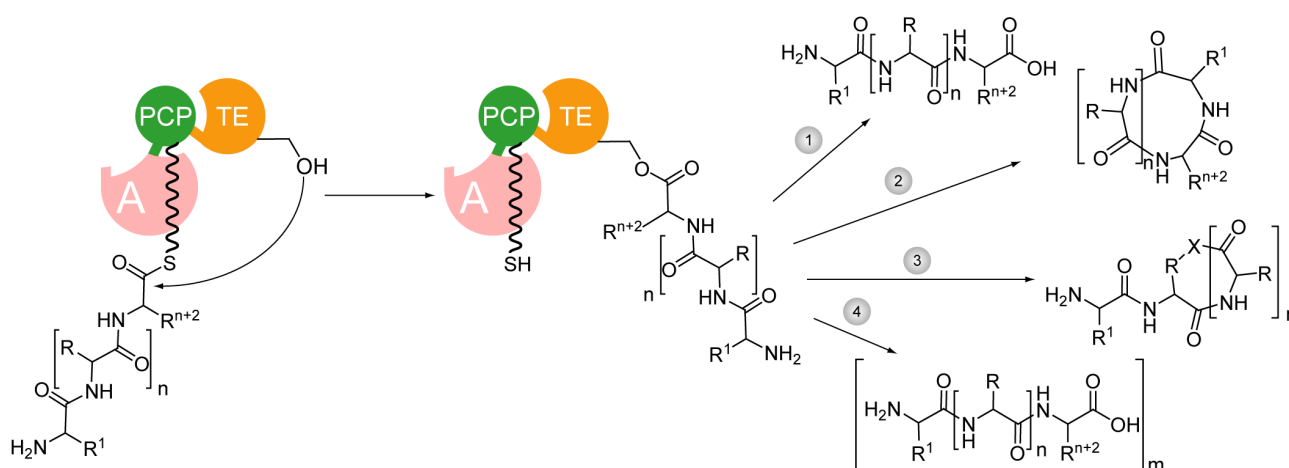


Abb. 1.9: Schematische Reaktion der TE-Domäne. Übertragung des Oligopeptids auf den aktiven Serinrest und anschließende Produktfreisetzung über Hydrolyse mit Wasser (1), *head-to-tail*-Zyklisierung (2), verzweigte Zyklisierung (3) und Oligomerisierung (4).

Die Notwendigkeit der TE-Domäne für die Biosynthese eines nichtribosomal assemblierten Peptids wurde zuerst von Schneider und Marahiel durch Deletion der TE-Domäne der Surfactin-Synthetase SrfAC beschrieben, die zu einer Reduktion der Surfactin-Produktion um 97% führte.⁸² TE-Domänen weisen eine katalytische Triade aus einem Serin in dem konservierten Motiv GxSxG, einem Histidin und einem Aspartat (Ser80, His207, Asp107 in der TE von SrfAC) ähnlich zu Serinproteasen auf, die zur Deprotonierung der Serinseitenkette und damit zur Bildung eines

reaktiven Oxyanions führt.⁸² Dieses übernimmt die Oligopeptidkette durch Angriff auf den Thioester zur PCP-Domäne des Terminationsmoduls unter Ausbildung eines Acyl-*O*-TE-Oxoesters (Abb. 1.9).⁸³ Die Freisetzung des Oligopeptids erfolgt durch einen nukleophilen Angriff auf diesen Oxoester über einen tetraedrischen Übergangszustand, der vermutlich ähnlich wie in Serinproteasen durch ein Oxyanion-Loch aus dem Amidrückgrat in der Bindungstasche der TE-Domäne stabilisiert werden kann.⁸⁴ Das Nukleophil kann dabei der N-Terminus des Oligopeptids sein, was zu einer *head-to-tail*-Makrolactamisierung führt, eine Seitenkette des Oligopeptids, wodurch ein verzweigt zyklisches Peptid mit einer Lacton- oder Lactamgruppe entsteht oder in manchen Fällen auch ein Wassermolekül, woraus ein lineares Peptid resultiert.⁸⁵ Beispiele für eine Makrozyklisierung sind die Peptide Surfactin oder Tyrocidin,⁸⁶⁻⁸⁷ Vertreter der selteneren Hydrolyse sind lineares Gramicidin, Yersiniabactin oder Vancomycin.^{21,88-89}

Eine weitere Möglichkeit der Produktfreisetzung ist die Oligomerisierung mehrerer Peptiduntereinheiten, in der die TE-Domäne als „Warteraum“ für die Intermediate dient, bevor die finale Zyklisierung zur Freisetzung des Oligomers führt. Beispiele für diese Strategie sind das Siderophor Enterobactin oder das Antibiotikum Gramicidin S.^{20,90} Die Mono- und Dimerintermediate des Trimers Enterobactin konnten in einer langsamer reagierenden TE-Variante, in der das katalytisch aktive Serin durch Cystein substituiert wurde, nachgewiesen werden und bestätigten damit den Oligomerisierungs-Mechanismus der TE-Domäne.⁹¹

Die Faltung der TE-Domänen gehört zu der Familie der α/β -Hydrolasen, wie zuerst durch die Kristallstrukturanalyse der TE von SrfAC gezeigt werden konnte (Abb. 1.10).⁹² Desweiteren konnten zwei hydrophobe Bindungstaschen für Leucin an Position 6 und 7 des Oligopeptids identifiziert werden, wodurch die Theorie der Vorfaltung des Peptids gestützt wird. Die TE-Struktur weist eine Deckel-Region (*lid region*) auf, die durch Domänenbewegung eine offene und geschlossene Struktur einnehmen kann.⁹³ Diese Region ist vermutlich für die Substraterkennung und Positionierung zuständig, außerdem könnte sie die Peptidkette vor unkontrollierter Hydrolyse z.B. durch Wasser schützen.⁹² Es wird daher davon ausgegangen, dass TE-Domänen, die eine Makrozyklisierung vornehmen, in der geschlossen Konformation arbeiten, wohingegen TE-Domänen, die eine Hydrolyse katalysieren, eher in der offenen Konformation vorliegen. Eine andere Theorie geht davon aus, dass die Peptidkette selbst den Oxoester abschirmt und so Nebenreaktionen vermieden werden.⁹⁴

Biochemische Studien von TE-Domänen zeigten, dass diese häufig eine relaxierte Substratspezifität aufweisen und sogar Ringvergrößerungen oder Verkleinerungen möglich sind.⁸⁶⁻⁸⁷ Außerdem

können neben beladenen PCP-Domänen⁹⁵ auch CP-Analoga wie *N*-Acetylcysteamin (SNAC)⁸⁷ oder Thiophenole⁹⁶ verwendet werden, ohne die Zyklisierungsaktivität der TE-Domänen zu beeinflussen. Diese Tatsache macht TE-Domänen zu einem vielversprechenden Katalysator, der in chemoenzymatischen Ansätzen zur Herstellung von zyklischen, biologisch aktiven Peptiden eingesetzt werden kann.^{79,97}

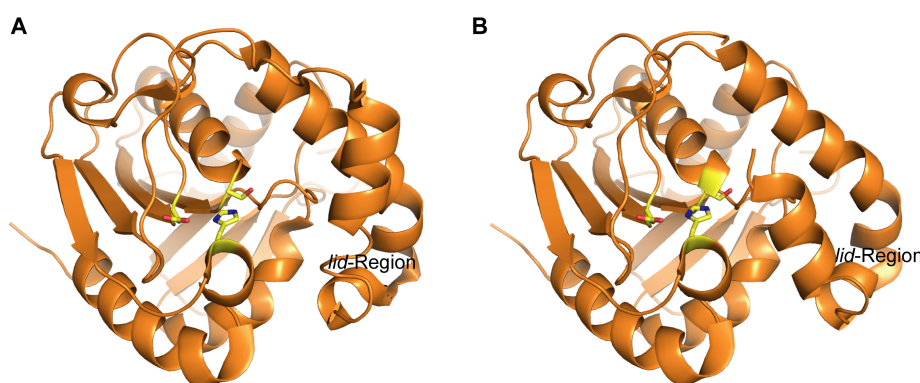


Abb. 1.10: Struktur der TE-Domäne aus SrfAC in der offenen (A) und der geschlossenen (B) Form (PDB-Code: 1JMK). Die katalytische Triade in der aktiven Tasche ist in gelb als Stabmodell hervorgehoben.

Die Freisetzung der Peptide kann alternativ auch durch C-Domänen erfolgen (s. 1.1.1.3), was bisher besonders in fungalen Systemen makrozyklischer Peptide beobachtet wurde oder durch Reduktase(R)-Domänen, die NAD(P)H-abhängig das lineare Peptid durch Reduktion des C-Terminus zu einem Aldehyd oder Aminoalkohol reduzieren. Im Falle der Nostocyclopeptide wird durch eine R-Domäne ein Aldehyd hergestellt, der anschließend mit einer Aminogruppe intramolekular zu einem Imin reagiert, wodurch ein zyklisches Produkt entsteht.⁹⁸ Der C-Terminus von linearem Gramicidin hingegen wird durch eine R-Domäne zu einer Alkoholgruppe reduziert und damit als lineares Peptid freigesetzt.²¹

1.1.2 Externe Thioesterasen des Typs II

Um eine effektive und korrekte Peptidsynthese zu gewährleisten, nutzen NRPS-Systeme eine spezialisierte Thioesterase, die Reparaturaktivitäten übernimmt.¹⁵ Diese Thioesterasen sind in der Regel alleinstehende Enzyme (TEII), die im biosynthetischen Gencluster von NRP kodiert sind. Da bis zu 80% des Coenzym A in einer Zelle acyliert vorliegen können⁹⁹, wobei gerade Acetyl-CoA einen wesentlichen Teil ausmacht, kann es zusammen mit der Promiskuität der PPTasen wie Sfp zu einer Fehlbeladung (*mispriming*) der PCP-Domänen während der posttranslationalen Modifikation

kommen, wodurch die Thiolgruppe des Ppant-Kofaktors nicht für die Bindung einer Aminosäure zur Verfügung steht. Auch die Beladung der *holo*-PCP mit einer falschen Aminosäure durch die A-Domäne kann aufgrund von anschließend auftretenden Selektivitäten zu einer inaktiven NRPS führen. Um diese inhibierten Ppant-Arme zu regenerieren, hydrolysieren TEII-Enzyme den Thioester zwischen Acyl- oder Peptidylresten und des Ppant-Arms der entsprechenden PCP-Domäne in blockierten NRPS-Modulen (Abb. 1.11A). Diese Aktivität konnte zuerst für die TEII-Enzyme des Surfactin- und Bacitracin-Biosynthesegenclusters (Srf-TEII und Bac-TEII) gezeigt werden, wobei auch beobachtet wurde, dass die Produktionsrate der NRPS unbeeinflusst von der TEII-Anwesenheit blieb.¹⁰⁰ Eine Mutationsstudie der Srf-TEII enthüllte eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Ser86, Asp190 und His216, wodurch die Verwandtschaft zu TEI-Domänen unterstrichen wurde.¹⁰¹ Die Struktur der SrfTEII wurde von Koglin *et al.* durch NMR-Studien gelöst und bestätigten die aus Sequenzanalysen vermutete Faltung der α/β -Hydrolasen, in der ein siebensträngiges β -Faltblatt von acht Helices umgeben ist (Abb. 1.11B).⁵⁶

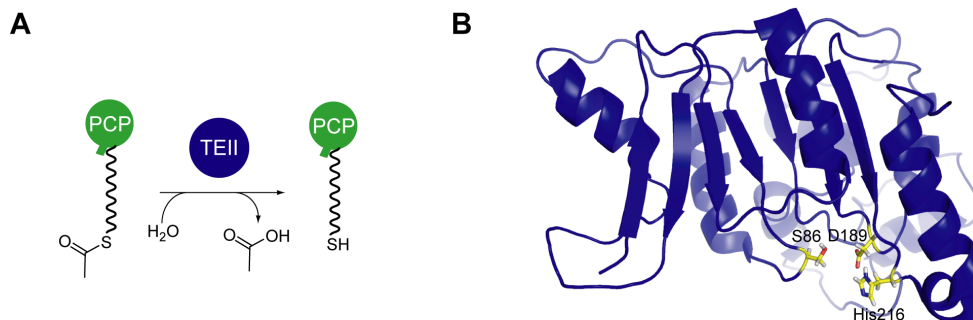


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Reparaturreaktion von externen Thioesterasen des TypsII (A) und die Struktur von SrfA-TEII (B). Die katalytische Triade ist in gelb als Stabmodell hervorgehoben (PDB-Code: 2RON).

Eine *lid*-Region bedeckt die aktive Tasche nur teilweise, desweiteren konnten zwei distinkte Konformationen nachgewiesen werden, ähnlich wie für die TEI-Domäne aus EntF.⁹³ Die Wechselwirkung mit der *holo*-PCP-Domäne TycC3-PCP erfolgte nur in einer der beiden Konformationen. Während SrfTEII die Hydrolyse von kleineren Substraten wie Acetylreste bevorzugt, konnte für die TEII RifR aus dem Gencluster der Rifamycin-Biosynthese eine breite Substratspezifität nachgewiesen werden, die Struktur von RifR zeigt große Ähnlichkeiten zu der von SrfTEII.¹⁰²

1.1.3 *In cis* agierende, optionale Domänen und *in trans* agierende Modifikationsenzyme

Zur Modifizierung der nichtribosomal synthetisierten Peptide tragen weitere Hilfsdomänen bei, die zusätzlich in dem jeweiligen Modul entweder zwischen zwei Domänen oder eingebettet in eine andere Domäne vorhanden sein können.¹⁰³ Auf einige Beispiele wird im folgenden Abschnitt kurz eingegangen.

1.1.3.1 Epimerisierung

Viele der durch NRPS-Systeme assemblierten Naturstoffe enthalten *D*-konfigurierte Aminosäuren, die unter anderem zur Stabilität gegen Proteasen beitragen. Prinzipiell sind drei Mechanismen bekannt, die für den Einbau einer *D*-Aminosäure sorgen: Die Erkennung und Aktivierung einer *D*-Aminosäure durch die A-Domäne,¹⁰⁴ die Epimerisierung durch eine E-Domäne am C-Terminus des jeweiligen Moduls oder die Epimerisierung durch eine sogenannte duale C/E-Domäne anstelle einer C-Domäne in einem Elongationsmodul. Die am besten untersuchte Strategie ist die Inversion des C_α-Atoms einer PCP-gebundenen Aminosäure durch eine Epimerisierungs(E)-Domäne (Abb. 1.2).¹⁵ Diese ist am C-Terminus eines Moduls zu finden (C-A-T-E), enthält etwa 400 Aminosäuren und kommt in unzähligen NRPS-Systemen vor, z.B. in der Synthese von Surfactin, Tyrocidin oder Vancomycin.^{88,105-106}

Die Inversion des C_α-Atoms ist eine Gleichgewichtsreaktion und resultiert in einem Gemisch aus *D*- und *L*-konfigurierten Aminosäuren.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ E-Domänen können sowohl in einem Initiationsmodul einzelne Aminosäuren¹⁰⁹ invertieren als auch die C-terminale Aminosäure eines PCP-gebundenen Peptidylrests¹¹⁰, wenn sie in einem Elongationsmodul vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass zunächst die Kondensation der zu invertierenden Aminosäure in der C-Domäne des gleichen Moduls abläuft, dann die Racemisierung stattfindet und anschließend die Kondensation im *downstream* liegenden Modul erfolgt, bei der die folgende ^DC_L-Domäne als Filter für den *D*-konfigurierten Rest fungiert (s. 1.1.1.3).¹¹¹ E-Domänen sind neben der Epimerisierung auch bedeutend für NRPS-Interaktionen und für die Kontrolle über den zeitlich korrekten Ablauf der Kondensations- und Epimerisierungsreaktionen.¹¹¹⁻¹¹³

Eine weitere Möglichkeit in NRPS-Systemen, *D*-Aminosäuren einzubauen, wurde kürzlich von Balibar *et al.* beschrieben.¹¹⁴ In den NRPS ArfA und ArfB zur Assemblierung des Lipopeptidolactons Arthrofactin sind keine E-Domänen zu finden, obwohl sechs von elf Aminosäuren im Produkt *D*-konfiguriert sind. Balibar *et al.* konnten eine neue Klasse von

C-Domänen in ArfA und ArfB identifizieren, die zusätzlich zu der Kondensationsaktivität eine intrinsische Epimerisierungsaktivität aufweisen.¹¹⁴ Besonders in der N-terminalen Sequenz zeigen diese dualen C/E-Domänen deutliche Unterschiede zu Elongations-C-Domänen und enthalten zusätzlich zu dem bereits bekannten Histidin-Motiv ein weiteres elongiertes Histidin-Motiv HH[I/L]xxxxDG in den Kernmotiven C1 und C2 (s. Anhang 9.2).^{64,114} Die Epimerisierung der *upstream* PCP-gebundenen Aminosäure erfolgt erst nach Beladung der *downstream* PCP-Domäne mit der entsprechenden Aminosäure, an die sich die Kondensationsreaktion der beiden Aminosäuren anschließt. Der C/E-Domäne von ArfA konnte wie der ^DC_L-Domäne eine Spezifität für das D-konfigurierte Donorsubstrat nachgewiesen werden.

Durch Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass auch weitere Systeme existieren, die eine C/E-Domäne enthalten, beispielsweise die NRPS von Syringomycin, Ramoplanin oder Lysobactin.¹¹⁴⁻¹¹⁵ Besonders Biosynthese-Systeme von Lipopeptiden in *Pseudomonas* spp. zeigen eine häufige Verwendung von C/E-Domänen.⁷⁷

Phylogenetische Studien zeigten, dass C/E- und ^DC_L-Domänen von einem gemeinsamen Vorläufer der C-Domäne abstammen und zeigen besonders im Kernmotiv C5 eine hohe Homologie, was durch das gemeinsame D-konfigurierte Substrat erklärt werden könnte.⁶⁴

1.1.3.2 Heterozyklisierung, Oxidations- und Reduktionsreaktionen

Eine Reihe von nichtribosomal synthetisierten Peptiden enthalten heterozyklische Fünfringe, wie z.B. Thiazoline oder Oxazoline, die von Cystein oder Serin und Threoninresten gebildet werden und wichtig für die Chelatisierung von Metallen in Siderophoren oder die Interaktion mit Proteinen, DNA oder RNA sind.⁵¹ Vibriobactin, Anguibactin und Bacitracin sind prominente Beispiele für Peptide mit heterozyklischen Systemen.^{24,116-117} Die Bildung dieser Ringe wird durch sogenannte Zyklisierungs(Cy)-Domänen katalysiert, die in dem jeweiligen Modul die C-Domäne ersetzen. Sie enthalten das konservierte katalytische Motiv DxxxxDxxS und sind sequenziell und funktionell eng mit C-Domänen verwandt.^{64,118} Die Reaktion läuft in drei Schritten ab (Abb. 1.12): Zunächst wird das PCP-gebundene Cystein/Serin/Threonin mit dem Donorsubstrat Aminoacyl-S-PCP_{upstream} kondensiert, worauf der Angriff des Cysteinthiols oder der Hydroxygruppe von Serin/Threonin auf die neu gebildete Peptidbindung erfolgt. Durch eine abschließende Dehydratisierung wird der Thiazolin/Oxazolin-Ring gebildet.¹⁵

Durch Mutationsstudien der Zyklisierungs-Domänen aus VibF (Vibriobactin-Synthetase) und BacA (Bacitracin-Synthetase) konnte gezeigt werden, dass die Kondensation und die Zyklisierung unabhängige Reaktionen sind.¹¹⁹⁻¹²⁰

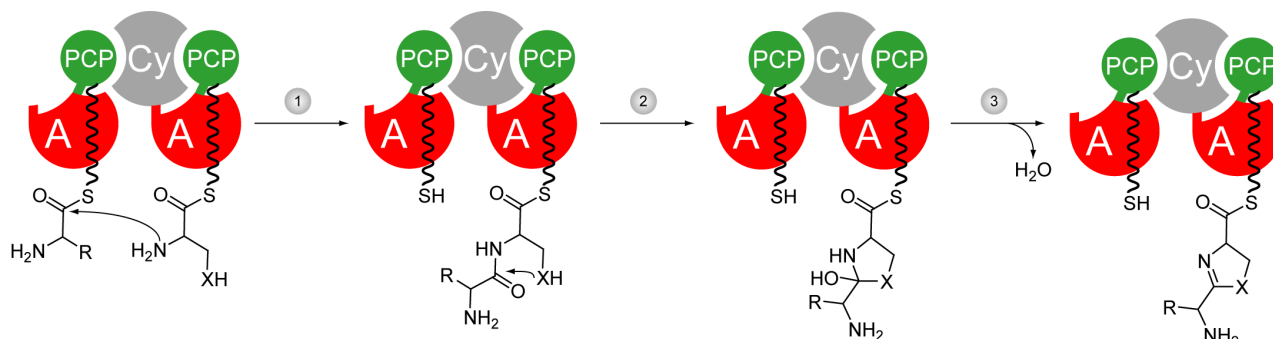


Abb. 1.12: Heterozyklisierung durch Cy-Domänen-Katalyse. Zunächst erfolgt die Peptidbindungsknüpfung (1) und die Zyklisierung (2), eine anschließende Dehydratisierung (3) ergibt den Heterozyklus. X = O,S.

Die Varianten N900A und S984A in der Bacitracin-Cy-Domäne führten zur Produktion von linearen Dipeptiden, die zwar kondensiert, jedoch nicht cyclisiert wurden.¹¹⁹ Strukturvergleiche mit VibH legten nahe, dass diese Reste an der Bildung des Solventkanals für die Cyclisierung beteiligt sind und damit eine strukturelle Rolle in der Heterozyklisierungsreaktion einnehmen. Untersuchungen der Cy-Domänen aus VibF und EpoA erlaubten die Bestimmung einer ausgeprägten Substratspezifität für die Donor- und Akzeptorseite und der kinetischen Parameter der Cyclisierungsreaktion.¹²¹⁻¹²²

Während die eben angesprochenen Cy-Domänen in dem Modulverband einer NRPS eingebettet sind, wurden in der Biosynthese von Anguibactin zwei freistehende Cy-Domänen identifiziert, deren Notwendigkeit für die Produktbildung gezeigt wurde.¹¹⁶

Die gebildeten Thiazolin- und Oxazolinringe werden häufig weiter durch Oxidationen oder Reduktionen modifiziert. Die Oxidation zu Thiazol- bzw. Oxazolringen z.B. in der Synthese von Bleomycin oder Epothilon geschieht in einer FMN-abhängigen Reaktion durch Oxidations(Ox)-Domänen¹²³, die entweder am C-Terminus eines Moduls liegen oder in das C-terminale Ende der A-Domäne insertiert sind.¹²⁴ Reduktionen zu Thiazolidin- bzw. Oxazolidinringen wird durch Reduktions(R)-Domänen in einer NAD(P)H-abhängigen Reaktion realisiert, wie beispielsweise in der Biosynthese von Pyochelin beobachtet wird.¹²⁵ Neben der Modifikation von Heterozyklen übernehmen Ox- und R-Domänen auch andere Funktionen. In der Synthese von Indigoidin z.B. ist eine Ox-Domäne beobachtet worden, die vermutlich an der Ausbildung einer C-C-Bindung zwischen Glutaminresten beteiligt ist.¹²⁶ R-Domänen hingegen können wie schon angesprochen

auch die Freisetzung der assemblierten Peptide katalysieren, wie z.B. in der Synthese von Myxochelin.¹²⁷

1.1.3.3 Methylierungen

N- oder *C*-Methylierungen sind eine weitere häufig zu findende Modifikation von nichtribosomalen Peptiden, die wichtig für die Bioaktivität und die strukturelle Konformation des Produkts sind. In der Synthese von Cyclosporin¹²⁸ und Pyochelin¹²⁹ beispielsweise werden die *N*-Methylierungen durch etwa 420 Aminosäuren umfassende Methylierungs(Mt)-Domänen eingeführt, die C-terminal von der A-Domäne liegen. Der Donor der Methylgruppe ist in diesen Reaktionen *S*-Adenosylmethionin (SAM). Einige *N*-Methylierungen werden auch durch *in trans* agierende Methyltransferasen vorgenommen, wie in der Chloroeremomycin-Biosynthese durch MtfA.¹³⁰ *C*-Methylierungen hingegen werden in der NRPS durchgehend von externen Methyltransferasen katalysiert, die den Vorläufer des Monomers als Substrat verwenden. Diese SAM- und α -Ketoglutarat-abhängigen Enzyme sind biochemisch für die Synthese von CDA, Daptomycin und A54145 untersucht worden.¹³¹

1.1.3.4 Formylierungen

Lineares Gramicidin und Anabaenopeptilide enthalten eine N-terminale Formylgruppe, die durch die bisher wenig charakterisierte Formylierungs(F)-Domäne in das Peptidrückgrat eingeführt wird.^{21,132} Die F-Domäne aus LgrA1, der Gramicidin-Synthetase, formyliert spezifisch PCP-gebundenes Valin in Anwesenheit des Kofaktors N¹⁰-Formyltetrahydrofolat und initiiert damit die Assemblierung des Peptids.¹³³ Formylierungen von Seitenketten wie beispielsweise von Ornithin werden auch durch *in trans* agierende Enzyme am Vorläufer des Monomers vorgenommen, wie für die Siderophore Rhodochelin und Coelichelin beobachtet werden konnte.¹³⁴⁻¹³⁵

1.1.3.5 Weitere Modifikationen

Zu der Strukturdiversität von NRP tragen eine Reihe von weiteren Modifikationsenzymen bei, die größtenteils *in trans* agieren. Dabei kann man diese anhand des Zeitpunkts unterscheiden, an dem die Modifikation stattfindet, die sowohl vor dem Einbau des Monomers an einem Vorläufer stattfinden kann, während der Peptidsynthese an dem NRPS-gebundenen Intermediat oder

postsynthetisch an dem freigesetzten Oligopeptid. Diese Modifikationen umfassen ein weites Spektrum an Reaktionen, zu denen unter anderem auch Lipidierungen, Halogenierungen, Hydroxylierungen und Glykosylierungen zählen.¹⁰³ Da diese Enzyme in dieser Arbeit jedoch keine bedeutendere Rolle spielen, wird hier nicht weiter auf diese Klassen eingegangen.

1.1.4 Einblick in ein Terminationsmodul und NRPS-Interaktionen

2008 gelang es Tanovic *et al.* die Struktur des Terminationsmoduls SrfAC zu lösen (Abb. 1.13). Diese NRPS besteht aus vier Domänen der Organisation C-A-PCP-TE. Die generelle Faltung der vier Domänen war homolog zu Strukturen der zuvor gelösten einzelnen Domänen (TycC-C6, PheA, TycC-PCP3 und SrfAC-TE) und bestätigte somit diese Strukturen in einer nativen NRPS ohne künstlich verkürzte N- oder C-Termini.

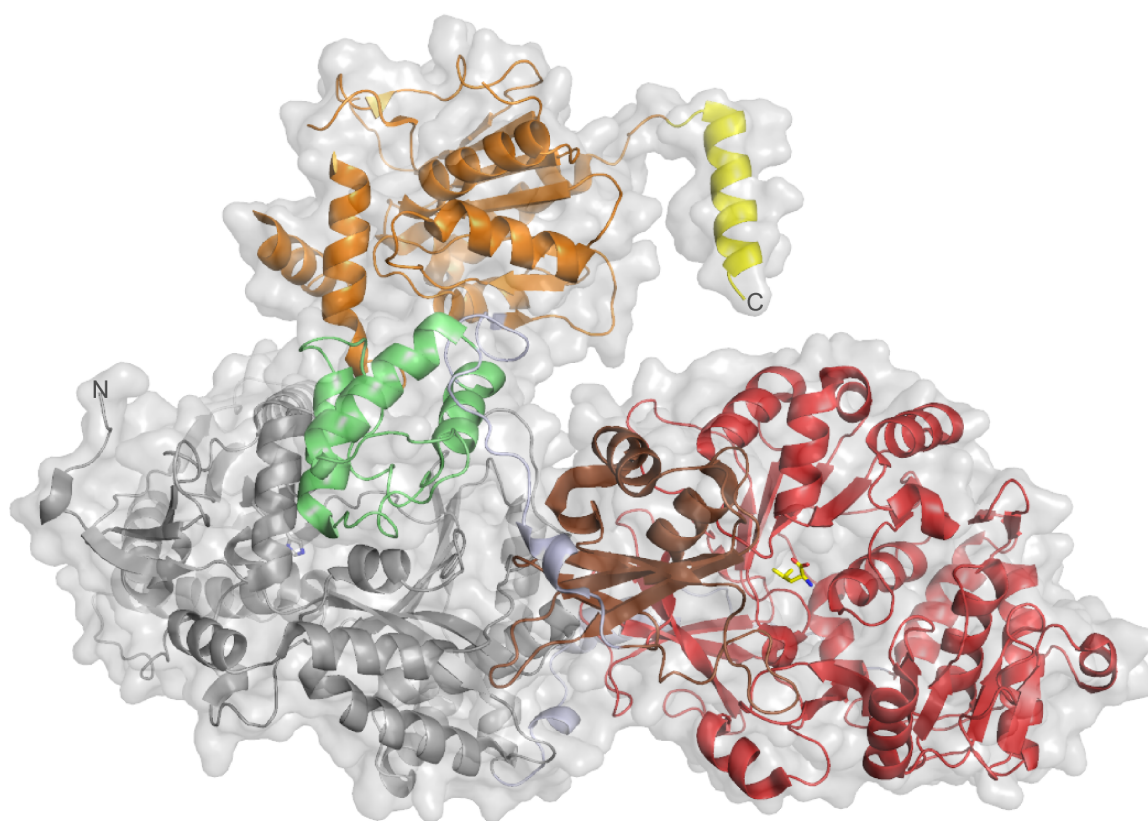


Abb. 1.13: Struktur des Terminationsmoduls SrfAC (PDB-Code: 2VSQ). Die C-Domäne ist in grau, die A_{core} -Domäne in rot, die A_{sub} -Domäne in braun, die PCP- Domäne in grün und die TE-Domäne in orange dargestellt. Das in der A-Domäne gebundene Substrat Leucin (gelb) und das katalytisch aktive Histidin der C-Domäne sind als Stabmodell hervorgehoben. Der C-terminale *myc*-His₆-Tag ist in gelb dargestellt.

Desweiteren konnten wichtige Einblicke in die Domänenorganisation relativ zueinander und deren Interaktionen gewonnen werden. Die C- und A-Domäne wiesen in der Struktur von SrfAC eine breite Interaktionsfläche zueinander auf, die auch durch definierte Wechselwirkungen mit der L-förmigen Linkerregion stabilisiert wurde. Dadurch bilden die C- und A_{Core}-Domäne eine katalytische Plattform, die während des Katalysezyklus vermutlich relativ unverändert bleibt. Demnach würden die Interaktionen mit der außerhalb dieser Ebene liegenden PCP- und A_{sub}-Domäne durch Bewegung dieser kleineren Domänen realisiert werden, um die einzelnen Reaktionsschritte zu ermöglichen.

Die PCP-Domäne befand sich in der A/H-Form und war so organisiert, dass die Entfernung des konservierten Serinrests (S1003) zu dem katalytischen Histidin der C-Domäne (H147) innerhalb der Reichweite eines Ppant-Arms wäre. Die Struktur stellt daher einen Zustand dar, der während der Peptidbindungsknüpfung auftreten könnte. Die Interaktionsfläche dieser beiden Domänen wurde durch die PCP-Helices II und III (α P2 und α P3) aufgespannt, die mit den Helices α C1 und α C10 der C-Domäne wechselwirkten. Drei konservierte Reste innerhalb dieser Helices wurden bereits als essentiell für eine konstruktive Interaktion zwischen einer PCP- und C-Domäne aus der NRPS EntB identifiziert. In einer weiteren Studie konnten zwei Reste der PCP-Helix III von EntF identifiziert werden, die notwendig für die Interaktion mit der TE-Domäne sind. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Helix III bei der Kontrolle der konformationellen Änderungen zur Interaktion mit verschiedenen Domänen eine wesentliche Rolle spielt.

Die Struktur von SrfAC konnte auch Einblicke in die intermolekulare Wechselwirkung von NRPS geben. Die N-terminale Region der C-Domäne bildete eine handähnliche Struktur, welche die α -Helix des *myc*-His₆-Affinitäts-Tags umschloss. Diese Tag-Helix weist eine gewisse Ähnlichkeit in der Sequenz und Polaritätsverteilung mit der C-terminalen Helix von SrfAB auf, die in früheren Studien als COM-Helix (*communication mediating*) identifiziert wurde und die Erkennung der aufeinander folgenden Synthetasen sicherstellt. Die daraus entstandene Theorie, dass zwei miteinander kooperierende NRPS sich über komplementäre Struktur motive der C- und N-Termini erkennen, wird durch diese Beobachtung in der SrfAC-Struktur gestützt.

1.2 Nichtribosomal synthetisierte Lipopeptide

Eine bereits angesprochene Modifikation der NRP ist die *N*-Acylierung der N-terminalen Aminosäure des Peptidrückgrats mit einem Fettsäurerest. Diese sogenannten Lipopeptide variieren

in der Regel in der Länge oder Verzweigung der Fettsäure und bilden so ein Gemisch aus verschiedenen Lipopeptiden. Eine Ausnahme bildet das saure Lipopeptid CDA (engl.: *calcium dependent antibiotic*), das einen invarianten 2,3-Epoxyhexanoylrest enthält (s. 1.2.2).¹³⁶ Lipopeptide weisen verschiedenste biologische Aktivitäten wie antimikrobielle oder inhibitorische Eigenschaften auf. Außerdem sind viele Lipopeptide in der gerichteten Motilität zur Ausbreitung einer bakteriellen Population (*swarming motility*) und in der Formation von Biofilmen des Produzentenstammes beteiligt.⁷⁷ Die meisten Lipopeptide weisen eine zyklische Struktur auf, die häufig durch Kondensation des C-Terminus und einer 3-Hydroxy- oder 3-Aminogruppe des Fettsäurerestes aufgebaut wird. Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften aus dem Lipid- und Peptidanteil sind Lipopeptide potente Biotenside, die Oberflächen- und Grenzflächenspannungen effektiv reduzieren können. Außerdem sichert der hydrophile Anteil eine gewisse Löslichkeit des Stoffs, der lipophile Anteil ermöglicht jedoch gleichzeitig eine Wechselwirkung mit Lipiden wie z.B. Phospholipidmembranen, woraus antibakterielle Eigenschaften entstehen können, die Lipopeptide zu einem interessanten Forschungsgebiet für pharmazeutische Anwendungen machen.⁷⁴ Aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit und teilweise niedrigeren Toxizität gegenüber chemisch synthetisierten Tensiden, sind Lipopeptid-Biotenside ebenfalls eine attraktive Alternative für Anwendungen z.B. in der Landwirtschaft, Lebensmittel- oder pharmazeutisch-industriellen Bereichen.¹³⁷ Die ersten Lipopeptide wurden aus dem Gram-positiven Organismus *Bacillus subtilis* isoliert, bis heute sind eine Vielzahl weiterer Lipopeptide u.a. aus weiteren *Bacillus* Stämmen oder Gram-negativen *Pseudomonas* Stämmen bekannt.¹³⁸ Die meisten dieser Lipopeptide sind Produkte aus NRPS- oder NRPS/PKS-Hybridsystemen. NRPS-Systeme, die ein Lipopeptid produzieren, weisen eine N-terminale C-Domäne im Initiationsmodul auf, die eine eigene Subgruppe der C-Domänen darstellen (s. 1.1.1.3). Der Einbau erfolgt vermutlich nach Synthese und Aktivierung der Fettsäure durch Katalyse dieser Initiations-C-Domäne, die demnach als Acyltransferase fungieren würde. Die Synthese der Fettsäure für das Lipopeptid CDA wurde bereits untersucht,¹³⁹ ebenso wie die Aktivierung der Fettsäure für die Synthese von Daptomycin,¹⁴⁰ eine biochemische Charakterisierung der Übertragung auf das Peptidrückgrat war zu Beginn dieser Arbeit jedoch für kein Lipopeptid vorhanden. Im folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Lipopeptide Surfactin und CDA genauer vorgestellt, einschließlich ihrer Struktur und Biosynthese.

1.2.1 Das Lipoheptapeptid Surfactin

Das erste, 1968 isolierte nichtribosomal synthetisierte Biotensid war das Lipoheptapeptid Surfactin aus *Bacillus subtilis*.¹³⁸ Die Primärsequenz des Naturstoffs konnte kurz darauf geklärt werden und besteht aus einer 3(R)-Hydroxyfettsäure, die zwischen 13 und 15 Kohlenstoffatomen enthält und entweder linear oder als *iso*-Fettsäure vorliegt, und einem peptidischen Rückgrat aus sieben Aminosäuren, von denen zwei polare Seitenketten besitzen (Glutamat an Position 1 und Aspartat an Position 5), während die anderen fünf hydrophobe aliphatische Reste aufweisen (Valin und Leucin, Abb. 1.14A).¹⁴¹⁻¹⁴² Leucin an Position 7 ist in manchen Surfactin-Varianten durch Valin oder Isoleucin substituiert. Die Aminosäuren Leucin an Position 3 und 6 sind D-konfiguriert und tragen wesentlich zu der durch NMR-Studien gelösten sattelförmigen β -Faltblatt-Struktur bei, in der die beiden polaren Reste eine kleine hydrophile Subdomäne auf einer Seite des Sattels bilden und die unpolaren Reste eine größere hydrophobe Subdomäne (Abb. 1.14B).¹⁴³⁻¹⁴⁴

Die biologischen Aktivitäten von Surfactin umfassen ein breites Spektrum, das antibiotische, -tumorale, -mycoplasmatische und biotensidische Eigenschaften beinhaltet¹⁴⁵⁻¹⁴⁹ und damit einen interessanten Naturstoff für verschiedene Anwendungen im pharmazeutischen oder ökologischen Bereich darstellen, wobei besonders die biotensidischen Eigenschaften zusammen mit der biologischen Abbaubarkeit ökologische Argumente für die Verwendung von Surfactin liefern.^{137,150}

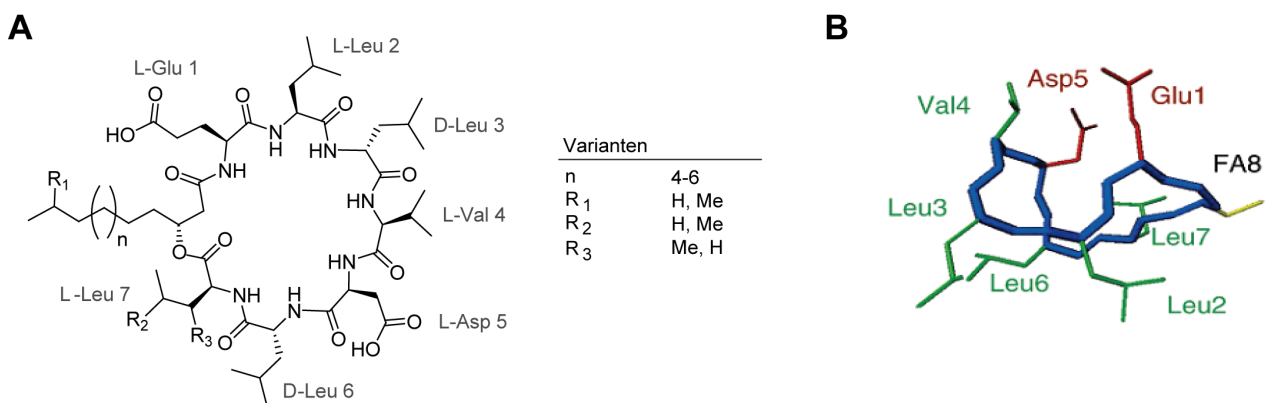


Abb. 1.14: Struktur von Surfactin und Varianten (A). Dreidimensionale Struktur von Surfactin (B, nach Tsan *et al.*¹⁴⁴), wobei das Peptidrückgrat in blau, die hydrophoben Seitenketten in grün und die polaren Seitenketten in rot gezeigt sind. Die Fettsäure (FA8) ist zur Vereinfachung nur bis zum Kohlenstoffatom C4 gezeigt (C3 und C4 in gelb).

Surfactin reduziert die Oberflächenspannung von Wasser bereits in einer Konzentration von 0.005% von 72 mNm^{-1} auf 27 mNm^{-1} .¹⁵⁰ Ein Nachteil für die pharmazeutische Anwendung ist die Cytotoxizität des Surfactins, das gegen Erythrozyten eine minimale Inhibitionskonzentration von $40 \text{ }\mu\text{M}$ aufweist.¹⁵¹ Durch seine anionischen Eigenschaften aufgrund der sauren Seitenketten

Glutamat und Aspartat ist Surfactin in der Lage, mono- und divalente Metallionen wie K^+ oder Ca^{2+} zu binden und mit Hilfe des amphiphilen Charakters durch organische Barrieren wie Phospholipidmembranen zu transportieren.¹⁵² Surfactin führt daher durch Wechselwirkung mit Zellmembranen zu einem K^+ -Verlust der Zelle, was in *Bacillus subtilis* ein wichtiger Bestandteil in der Signalgebung für die Aktivierung der Biofilm-Formation ist.¹⁵³ Neben der Rolle in der Biofilm-Formation unterstützt Surfactin auch die Ausbreitung von *Bacillus subtilis* auf festem Medium.¹⁵⁴ Die Biosynthese von Surfactin erfolgt am Ende der exponentiellen Wachstumsphase durch die NRPS SrfAA-SrfAC (Abb. 1.15).¹⁵⁵ Das Initiationsmodul der trimodularen NRPS SrfAA enthält eine Initiations-C-Domäne (s. 1.1.1.3) und wird gefolgt von zwei weiteren Modulen, von denen das letzte eine E-Domäne für den Einbau von D-Leucin₃ enthält. Die Synthese von Surfactin wird in Anwesenheit einer CoA-aktivierten Fettsäure initiiert.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ Das acylierte Tripeptid wird dann auf die zweite NRPS SrfAB übertragen, durch die drei Module elongiert, wobei Leucin₆ ebenfalls durch eine E-Domänen im letzten Modul in die D-Konfiguration überführt wird. Dieses Intermediat wird schließlich auf SrfAC übertragen, um eine weitere Aminosäure elongiert und schließlich durch die TE-Domäne zyklisiert, wodurch Surfactin freigesetzt wird.⁸³

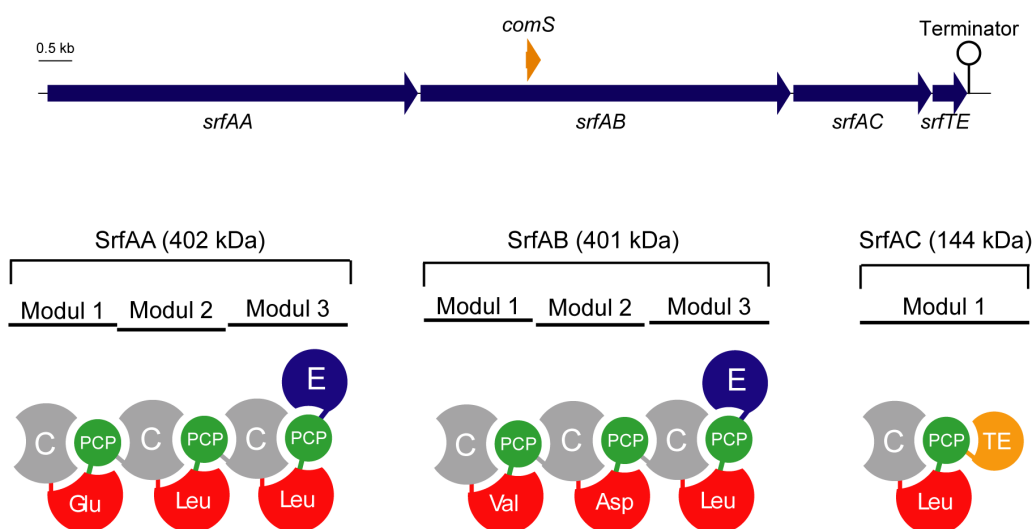


Abb. 1.15: Biosynthetisches Gencluster von Surfactin (oben) und die darin kodierte NRPS-Maschinerie (unten) aus den drei Synthetasen SrfAA, SrfAB, SrfAC. *comS* liegt ebenfalls in diesem Genlokus und ist an der Regulation zur Ausbildung der genetischen Kompetenz von *Bacillus subtilis* beteiligt.¹⁵⁸

Das Gencluster von Surfactin (*srfA*) wurde von mehreren Forschungsgruppen identifiziert^{17,155,159} und kodiert neben den erwähnten NRPS auch eine externe Thioesterase des Typs II, Srf-TEII, die Reparaturfunktionen übernimmt (Abb. 1.15).^{82,100,160} Außerdem wurde eine Beschleunigung der Surfactin-Initiation durch Anwesenheit der Srf-TEII gezeigt.¹⁵⁷ Das *priming* der NRPS wird durch

die PPTase Sfp katalysiert (s. 1.1.1.2), dessen Gen etwa 4 kb von dem *srfA*-Operon entfernt liegt. Die Regulation der Expression von *srfA* geschieht durch das Regulatorprotein ComA, das nach Phosphorylierung durch die Kinase ComP spezifisch an eine DNA-Region *upstream* des *srfA*-Operons bindet und so die Transkription der folgenden Gene begünstigt.¹⁶¹⁻¹⁶² Neben diesem Vorgang sind noch weitere Faktoren und komplexere Mechanismen bekannt, die die Transkription des *srfA*-Operons ebenfalls beeinflussen.⁷⁷

1.2.2 Das saure Lipodepsipeptid CDA

Hopwood *et al.* isolierten 1983 einen Naturstoff aus dem Modellorganismus *Streptomyces coelicolor* A3(2), der in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen starke antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Organismen wie *Bacillus subtilis* aufwies.¹⁶³ Diesem Verhalten verdanken diese als Lipopeptide identifizierten Moleküle auch ihren Namen CDA (engl. Akronym: *calcium-dependent antibiotics*). Bis heute sind neun Varianten dieses Antibiotikums bekannt, die sich in der Modifikation der Aminosäuren unterscheiden.^{136,164} CDA gehört zu der Klasse der sauren Lipopeptide, zu denen auch der prominente Vertreter Daptomycin gehört, das seit 2003 auf dem amerikanischen Markt als Cubicin® (Cubist Pharmaceuticals) zur Behandlung von Hautinfektionen durch Gram-positive Pathogene zugelassen ist.^{18,165-166} Weitere Beispiele für diese Klasse sind A54145 aus *Streptomyces fradiae* oder Friulimycin aus *Streptomyces friuliensis*.¹⁶⁷⁻¹⁶⁸ Merkmale der sauren Lipopeptide sind ein Lactonring aus zehn Aminosäuren des Peptidrückgrats, in dem an konservierten Positionen D-Aminosäuren auftreten und der das Calcium-Bindungsmotiv DxDG enthält.¹⁶⁹ Desweiteren weisen saure Lipopeptidantibiotika eine enorme Strukturvielfalt an nichtproteinogenen Aminosäuren auf und enthalten eine exocyclische Fettsäure, die N-terminal an das Peptidrückgrat gebunden ist und die biologische Aktivität maßgeblich beeinflusst, besonders die Toxizität und Effektivität der antibakteriellen Wirkung.¹⁷⁰⁻¹⁷¹ Die Biosynthese dieser Naturstoffklasse erfolgt durch NRPS. Das Lipopeptid CDA besteht aus insgesamt 11 Aminosäuren und einer invarianten 2,3(*trans*)-Epoxyhexansäure, die zusammen mit der N-terminalen Aminosäure Serin den exocyclischen Teil von CDA darstellt. Die Varianten von CDA enthalten bis zu fünf nichtproteinogene Aminosäuren aus D-Tryptophan₃, D-Hydroxyphenylglycin₆, D-Hydroxy-Asparagin₉ oder D-hydroxyphosphoryl-Asparagin₉, Methylglutamat₁₀ und 2',3'-Z-Tryptophan₁₁ (Abb. 1.16).¹³⁶

Der Lactonring wird über die Seitenkette von Thr₂ und dem Carboxyterminus von Trp₁₁ aufgebaut. Neben *Streptomyces coelicolor* produzieren auch manche eng verwandte Stämme wie *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces violaceoruber* K673 einige der CDA-Varianten.^{163,172}

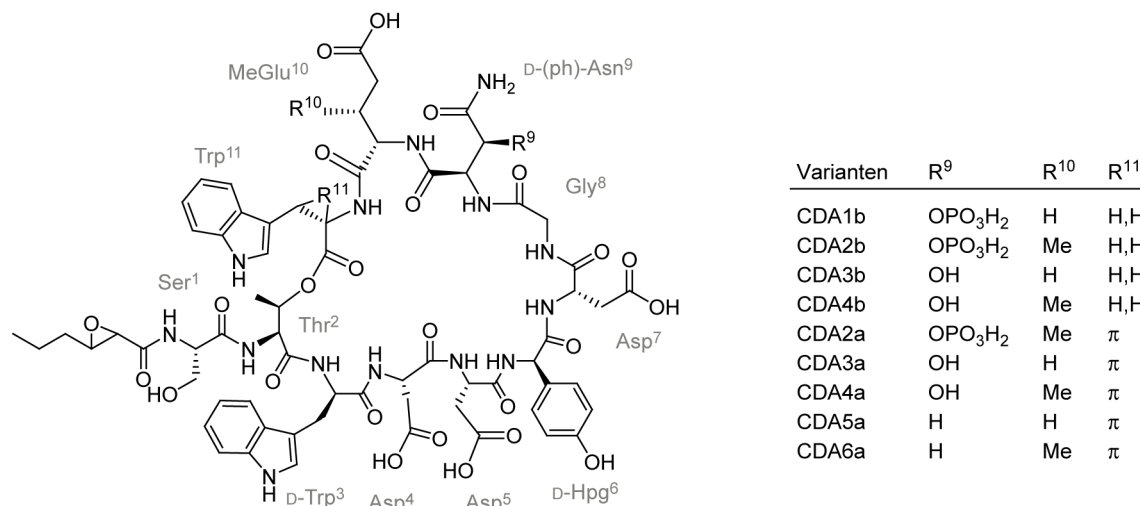


Abb. 1.16: Struktur und Varianten des sauren Lipopeptidantibiotikums CDA.

Das biosynthetische Gencluster von CDA ist etwa 82 kb groß und enthält neben drei NRPS-Genen eine Reihe an weiteren Genen, die Proteine kodieren, die vermutlich für die Synthese und Modifikation der nichtproteinogenen Aminosäuren, für die Fettsäuresynthese und -aktivierung, für Resistenzmechanismen und Regulation verantwortlich sind (Abb. 1.17).^{136,173}

Die Biosynthese beginnt vermutlich mit der Synthese der Fettsäure, von der postuliert wurde, dass zunächst Hexansäure von den β -Ketoacyl-ACP-Synthasen (KAS) II und III (FabF3 und FabH4) und Fettsäuresynthaseenzymen aus dem Primärmetabolismus direkt auf dem ebenfalls im Gencluster kodierten Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebildet wird.¹⁷⁴ Anschließend wird durch die FAD-abhängige Hexanoyl-ACP Oxidase HxcO bzw. Hexenoyl-ACP Monooxygenase HcmO die Epoxygruppe in die ACP-gebundene Fettsäure eingeführt.¹³⁹ Die folgende Übertragung auf die Aminogruppe von Serin könnte durch die N-terminale C-Domäne des Initiationsmoduls der ersten NRPS CdaPS1 katalysiert werden und die Elongation über die weiteren fünf Module von CdaPS1 initiieren. Darauf folgt die Elongation auf CdaPS2 um drei weitere Aminosäuren, während CdaPS3 die letzten zwei Aminosäuren anhängt (Abb. 1.17).

Die Stereoinvertierung zur Generierung der D-Aminosäuren werden durch E-Domänen in den entsprechenden Modulen realisiert. Durch Makrozyklisierung der TE-Domäne in CdaPS3 wird CDA schließlich freigesetzt.

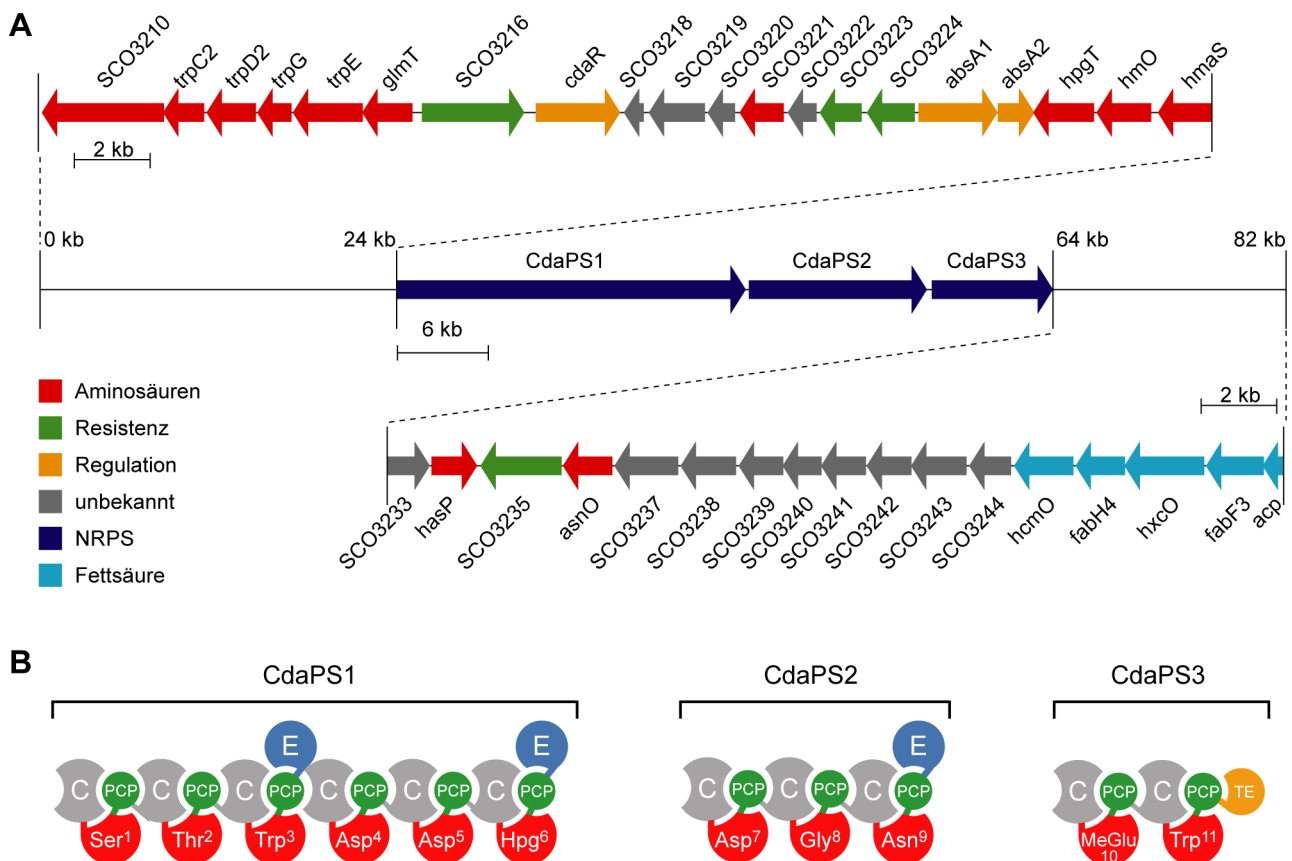


Abb. 1.17: A: Organisation des biosynthetischen Genclusters von CDA. Gene, die vermutlich an der Synthese der nichtproteinogenen Aminosäuren beteiligt sind, sind in rot dargestellt, die an der Fettsäuresynthese beteiligten in hellblau und Gene der NRPS in blau. Orange bzw. grün sind Gene, deren kodierte Proteine wahrscheinlich Funktionen in der Regulation bzw. der Resistenzausbildung übernehmen. Gene, deren Funktion unbekannt ist, sind in grau dargestellt. B: Organisation der drei NRPS CdaPS1-3, die für die Assemblierung von CDA zuständig sind.

Die Beteiligung mancher Modifikationsenzyme, deren Funktion aus dem biosynthetischen Gencluster durch Homologie-Untersuchungen postuliert wurde, konnte biochemisch bereits bestätigt werden. Die Oxidase AsnO wurde strukturell und biochemisch als Asparagin-Hydroxylase charakterisiert und HasP durch Deletionsstudien als Phosphotransferase, die zusammen für die Synthese des Vorläufers Hydroxyphosphoryl-Asparagin sorgen.¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ Auch die Bereitstellung von Methylglutamat konnte durch Charakterisierung der SAM- und α -Ketoglutarat-abhängigen Methyltransferase GlnT aufgeklärt werden.¹³¹

Die Wirkungsweise der sauren Lipopeptidantibiotika ist noch nicht im Detail aufgeklärt worden. Durch die Bindung von Ca^{2+} wird das durch die sauren Seitenketten als Anion vorliegende Peptid neutralisiert und bildet im Falle von Daptomycin nachgewiesene Micellen aus 14-16 Monomeren aus.¹⁷⁷ Diese Micellen können mit Zellmembranen wechselwirken und sichern eine hohe lokale

Konzentration des Lipopeptids an der Membran, das dort in die Lipid-Doppelschicht insertiert.¹⁷⁸ Für CDA wurde bereits gezeigt, dass es Kationenkanäle in Membranen formen kann¹⁶³, wodurch es zur Ausströmung von K^+ , Depolarisierung der Membran und schließlich zum Zelltod kommen kann.¹⁷⁹ Möglicherweise wird dieser Effekt durch eine Oligomerisierung des Lipopeptids in der Zellmembran verursacht. Der genaue Prozess, ob eine Oligomerisierung vorliegt oder die Membrandepolarisierung der einzige Grund für den Zelltod ist oder ob andere membranassoziierte Vorgänge wie Zellwandbiosynthese oder Zellteilung durch diesen Effekt gestört werden, ist noch unklar.

1.2.3 Bacitracin

Bereits seit 1945 ist das Antibiotikum Bacitracin bekannt, das von verschiedenen *Bacillus* Stämmen produziert wird, wie z.B. von *B. licheniformis*, und wurde besonders in den 60er Jahren als Breitbandantibiotikum eingesetzt.¹⁸⁰⁻¹⁸¹ Aufgrund seiner Nierentoxizität wird es heute nur noch als Bestandteil von Salben für dermatologische Behandlungen verwendet. Bacitracin ist ein Gemisch aus 15 verschiedenen Dodekapeptiden, dessen Hauptbestandteil (etwa 70%) Bacitracin A ist. Die Struktur zeichnet sich durch einen Thiazolin-Ring im N-terminalen Teil der Peptidkette aus, der von Ile₁ und Cys₂ aufgebaut wird (Abb. 1.18A).¹⁸² Desweiteren bilden die sieben C-terminalen Aminosäuren einen Makrolactamring, der über die ϵ -Aminogruppe von Lys₆ und dem Carboxyterminus geschlossen wird. Neben der nichtproteinogenen Aminosäure D-Ornithin sind noch drei weitere Aminosäuren (Glu₄, Phe₉, Asp₁₁) in Bacitracin D-konfiguriert. Die Varianten von Bacitracin A entstehen durch Desaminierung des N-Terminus zu einem Keton und Oxidation des Thiazolins zu einem Thiazolring (Bacitracin F) und durch Substitutionen der Aminosäuren an Position 3, 5 und 8 gegen Valin.

Die antibiotische Wirkung von Bacitracin ist höchstwahrscheinlich hauptsächlich durch die Inhibition der Zellwandbiosynthese von Gram-positiven Bakterien zu erklären. Der Thiazolinring von Bacitracin ist in der Lage, divalente Metallionen zu binden, wodurch ein ternärer Komplex mit C55-Isoprenyl-Pyrophosphat (IPP) gebildet werden kann. IPP ist ein in der Zellmembran verankerter Carrier, der für den Transport von Peptidoglykan-Untereinheiten (UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptide) durch die Membran zuständig ist.¹⁸³ Durch Dephosphorylierung zu C55-Isoprenyl-Phosphat (IP) kann ein neuer Transportzyklus eingeleitet werden. Die Komplexierung mit Bacitracin verhindert diese Dephosphorylierung, wodurch keine neuen

Bausteine mehr zum Ort der Peptidoglykan-Synthese transportiert werden können. Die so inhibierte Zellwandsynthese führt aufgrund des hohen inneren Drucks schließlich zum Zelltod.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶

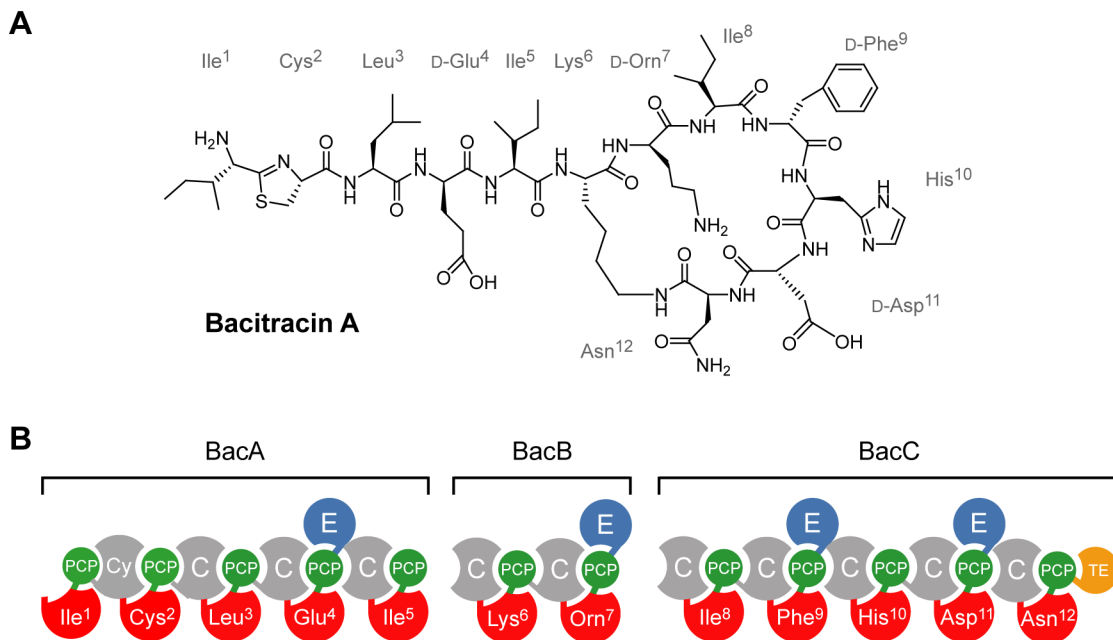


Abb. 1.18: Struktur von Bacitracin A (A) und Modul-Organisation der NRPS BacA-C (B).

Drei NRPS (BacA-C) sind für die Biosynthese von Bacitracin zuständig (s. Abb. 1.18B).¹¹⁷ BacA besteht aus fünf Modulen und verknüpft die N-terminalen fünf Aminosäuren miteinander. Das Modul 2 dieser NRPS enthält statt einer C-Domäne eine Cy-Domäne, die den Aufbau des Thiazolinrings katalysiert.¹¹⁹ Das Pentapeptid-Intermediat wird dann durch BacB um zwei weitere Aminosäuren verlängert, BacC elongiert das daraus resultierende Heptapeptid um fünf Aminosäuren und setzt Bacitracin durch Makrolactamisierung in der TE-Domäne frei. In der direkten Nähe der Gene *bacA*, *bacB* und *bacC* wurde das Zwei-Komponenten-System *bacRS* gefunden, das an der Regulation der Bacitracin-Biosynthesegene beteiligt ist.¹⁸⁷ Zusätzlich ist in diesem Genlokus auch ein ABC-Transporter kodiert, der durch Ausschleusung von Bacitracin eine Resistenz gegen das Antibiotikum vermittelt.¹⁸⁸⁻¹⁸⁹

1.3 Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL)

Ein Teilbereich dieser Arbeit ist die Charakterisierung von Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL) in *B. subtilis* und deren Beteiligung an der Produktion des Sekundärmetaboliten Surfactin. Daher wird diese Enzymklasse im folgenden kurz vorgestellt. Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (EC-Nummer:

6.2.1.3) gehören zu der Familie der Acyl-CoA-Synthetasen und katalysieren die Bildung eines energiereichen Thioesters zwischen der Carboxygruppe einer Fettsäure und Coenzym A (Abb. 1.19). Diese Reaktion geschieht in zwei Schritten und ist ATP- und Mg^{2+} -abhängig. Die Fettsäure wird zunächst durch Reaktion mit ATP adenyliert, wodurch Pyrophosphat entsteht. Diese Gleichgewichtsreaktion wird unter physiologischen Bedingungen durch schnell ablaufende Hydrolyse des Pyrophosphats zu energetisch stabilerem Orthophosphat auf die Seite der Produkte verschoben. Die Thiolgruppe von Coenzym A kann in einer anschließenden Reaktion das Fettsäureadenylat angreifen, wodurch der Thioester zwischen der Fettsäure und Coenzym A ausgebildet wird.

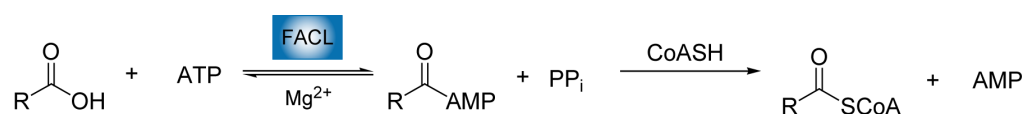


Abb. 1.19: Reaktionsschema der CoA-Aktivierung von Fettsäuren durch FACL.

Fettsäure-CoA-Derivate übernehmen diverse wichtige Rollen in biochemischen Prozessen in der Zelle.¹⁹⁰ Neben den prominenten Funktionen als Energielieferant in der Fettsäuredegradation (β -Oxidation)¹⁹¹ oder als Vorläufer für die Synthese von Phospholipiden sind Fettsäure-CoA-Thioester auch an dem Transport von Proteinen¹⁹²⁻¹⁹³, Enzymaktivierung¹⁹⁴, Proteinacylierung (beispielsweise zur Verankerung in Membranen)¹⁹⁵⁻¹⁹⁶, Zellsignal-¹⁹⁷ und Transkriptionskontrollwegen¹⁹⁸ beteiligt.

FACL weisen zwei konservierte Bereiche auf, die für die Bindung der Substrate wichtig sind.¹⁹⁹ Zum einen ist ein Nukleotid-Bindungsmotiv für die Bindung von ATP vorhanden, das den ATP/AMP-bindenden Enzymklassen gemein ist.²⁰⁰⁻²⁰² Zum anderen konnte durch Sequenzanalysen und Mutationsstudien der FACL FadD aus *E. coli* ein 25 Aminosäuren umfassendes Motiv identifiziert werden, das sowohl katalytische Funktionen hat, als auch in die Ausbildung der Spezifität für die Fettsäure involviert ist.¹⁹⁹ Das Spektrum der Fettsäuresubstrate, die von FACL akzeptiert werden, ist in der Regel vergleichbar breit, da die Länge, Sättigung und Verzweigung der in der Zelle vorkommenden Fettsäuren stark variieren kann. Besonders für die Degradation ist diese relaxierte Spezifität ein Vorteil, da so eine Reihe von Fettsäuren für die Energiegewinnung aus der β -Oxidation aktiviert und bereitgestellt werden kann.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, zur Aufklärung von Initiationsmechanismen in der nichtribosomalen Synthese von Lipopeptiden beizutragen. Obwohl innerhalb der letzten Jahrzehnte durch intensive Forschungsarbeit detaillierte Einblicke in die bakterielle, nichtribosomale Peptidsynthese gewonnen werden konnten und die essentiellen Reaktionsschritte sowie weitere Modifikationsreaktionen oder Vorläufersynthesen dieser besonderen und facettenreichen Biosynthesemaschinerie ausführlich beschrieben wurden, gab es zu Beginn dieser Arbeit wenig Informationen über die Inkorporation von Fettsäureresten in peptidische Naturstoffe und die damit zusammenhängende Rolle der C-Domänen in Initiationsmodulen von NRPS.

Durch Klonierung und heterologer Produktion in *E. coli* dieser ungewöhnlichen Klasse von C-Domänen aus den Synthetasen für die Surfactin- und CDA-Biosynthese (SrfAA und Cda-PS1) sollten die Lipidierungsschritte in der Biosynthese dieser Lipopeptide untersucht werden. Dazu wurde die Strategie gewählt, einzelne Domänen, wie die Initiations-C-Domänen von SrfAA und Cda-PS1 als alleinstehende Proteine zu produzieren, um Einzelreaktionen betrachten zu können. Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine sollte die Identifizierung der Substrate für den Fettsäuretransfer, der benötigten Enzyme und die Bestimmung der Spezifitäten ermöglichen. Dabei sollte im besonderen die Beteiligung der Initiations-C-Domäne in der Acylierungsreaktion des Peptidrückgrats der untersuchten Lipopeptide eingehend geklärt werden. Auch die Aktivierung der Fettsäure für die Übertragungsreaktion sollte besonders in der Lipoinitiation von Surfactin betrachtet werden. Substrate oder Substratanaloga mussten für die durchgeführten Studien teilweise chemisch synthetisiert werden, was besonders CoA-Derivate betraf, die für die gezielte Beladung von PCP-Domänen benötigt wurden. Des weiteren mussten geeignete Reaktionsbedingungen und Analyseverfahren mittels HPLC-MS etabliert werden, die eine zuverlässige und eindeutige Interpretation der durchgeführten Reaktionen erlauben. *In vivo* Studien in *B. subtilis* sollten die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse der Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion von Surfactin untermauern.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer mit der C-Domäne eng verwandten Domäne, der Zyklisierungs-Domäne aus der Bacitracin Synthetase BacA-Cy2. Auch hier wurde die Domäne als alleinstehendes Protein kloniert und produziert, wodurch die detaillierte Charakterisierung der ablaufenden Reaktion(en) und die Bestimmung der Spezifitäten ermöglicht werden sollte.

3 Verwendete Materialien

In diesem Kapitel sind die während der Erstellung der Arbeit verwendete Materialien wie Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien sowie Mikroorganismen oder Kulturmedien aufgeführt. In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen sind im Anhang aufgeführt (s. Anhang 9.1).

3.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders in Tabelle 3.1 aufgeführt, von den Herstellern Sigma-Aldrich, Fluka oder Merck in p.a. Reinheit bezogen. Kommerziell erhältliche Enzyme und die zugehörigen Puffer sowie Desoxyribonukleotide, 1kb- und 100bp-DNA-Marker wurden von New England BioLabs bezogen.

Tab. 3.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Produkt(e)	Hersteller
Ampicillin, IPTG, Kanamycin, Hefeextrakt, Coomassie	Amersham Biosciences European
Brilliant Blue G-250 und R-250, Agar Nr. 1	GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Biomol (Ilvesheim)
Multipettenaufsätze, Reaktionsgefäße 1.5 mL, 2.0 mL	Eppendorf
Agarose, Elektroporationsküvetten	Eurogentech
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas
Hi-Trap TM -Entsalzungssäulen, Gelfiltrationssäulen	GE-Healthcare
HPLC-Säulen	Macherey & Nagel
Amicon Ultrakonzentratoren, Dialysemembran 0.025 µm	Millipore
Oligonukleotide, GenElute TM Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
QIAquick Gel Extraction Kit, Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen
Ethidiumbromid, Acrylamidlösung, Glaskugeln, β-Mercaptoethanol	Roth
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL, Petri- Schalen, Sterilfilter, Einwegküvetten	Sarstedt
Bromphenolblau, Triton X-100	Serva
Coenzym A (Trilithium-Salz)	MP Biomedicals, LCC
pET28a(+)	Novagen

3 Verwendete Materialien

Produkt(e)	Hersteller
<i>E. coli</i> BL21(DE3), <i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen
Lösungsmittel HPLC-Reinheit	VWR
BC-Assay	Uptima Interchim

3.2 Verwendete Geräte

Tab. 3.2: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Typbezeichnung (Hersteller)
Analysewaagen	(Sartorius)
Autoklav	5075 ELV (Tuttnauer) FV A3/A1 (Fedegari Autoclavi S.P.A.)
Bidestillationsanlage für Wasser	Seralpur Pro90CN (Seral)
Brutschrank	Köttermann 2736
Dokumentation von DNA-Agarosegelen und SDS-PAGE-Gelen	Videokamera CS1 (Cybertech) Thermodrucker Video Copy Processor (Mitsubishi)
Elektroporations-Pulser	Gene Pulser und Pulse-Controller (Bio-Rad)
FPLC-System	FPLC-System 250 (Pharmacia FPLC-Biotechnology): Gradienten-Programmer GP-250, Pumpe P-500, Uvicord Optische Einheit UV-1 ($\lambda = 280 \text{ nm}$), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal Flachbrettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege-Magnetventil PSV-100, Fraktionskollektor FRAC-100; Äkta Prime (Amersham pharmacia biotech)
French Pressure Cell Press	SIM Aminco
HPLC-MS-System	Hewlett Packard Series 1100 HPLC-System mit DAD- Detektor, Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und Agilent MSD 1100 ESI-MS
Luftschüttler	Series 25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific) Multitron (Infors HT)
Lyophilisationsgerät	Christ-Alpha 2-4 LSC
Nanodrop-Photometer	ND-1000 (PEQ-Lab)

Gerät	Typbezeichnung (Hersteller)
PCR-Kammer	Mastercycler personal (Eppendorf)
pH-Meter	Schott CG 840
Pipetten	Research Pipettes (Eppendorf, Gilson)
Rotationsverdampfer	VV2000 (Heidolph)
SDS-PAGE-Gelkammer	Mini-Protean 3 (BioRad)
Sterilbank	Antair BSK
Thermocycler	Thermomixer comfort (Eppendorf)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 103 H
Ultraschallgerät	Sonifier 250 (Branson), Sonde: CE Converter 102C
UV-Vis-Photometer	Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech)
Vakuumzentrifuge	Savant Speed Vac Concentrator, Uniequip Univapo 150 (Eppendorf)
Vortexer	Vortex Genie2 (Scientific Research)
Zentrifugen	Biofuge pico (Heraeus) Sorvall RC 6 Plus und 5B Plus (Thermo Scientific); Rotoren: SS34 oder F21S8x50y und SLA3000, Megafuge 1.0R, Minifuge RF (Kendro), Tischzentrifuge 5415 D (Eppendorf)

3.3 Verwendete Software und Online-Tools

In der folgenden Tabelle sind außer den gängigen Programmen wie z.B. zur Textverarbeitung die verwendeten Programme und Online-Tools zur Erstellung der Oligonukleotide, der Vektorkarten, zur sequenzbasierten Berechnung von Protein-Extinktionskoeffizienten und Sequenz- und Strukturanalysen aufgeführt.

Tab. 3.3: Verwendete Software und Online-Tools.

Programm / Tool	Hersteller / Internetportal
Origin 7.0	OriginLab
Clone Manager 6.0	Sci Ed Central
DNA Star	DNA Star Inc.
Adobe Illustrator 10	Adobe

3 Verwendete Materialien

Programm / Tool	Hersteller / Internetportal
Blast-Analysen und Alignments	National Center for Biotechnology Information (NCBI)
Proteinsequenz-Analysen	Prot-Param, PSI-pred (Swiss Institute of Bioinformatics ExPASy)
LC/MSD ChemStation B.01.03[204]	Agilent Technologies
Strukturvorhersagen	I-Tasser (Zhang Lab, University of Michigan)

3.4 Kulturmedien

Die hier angegebenen Medien wurden zur Kultivierung der weiter unten aufgeführten Stämme verwendet. Alle Medien, soweit nicht anders angegeben, wurden durch Autoklavieren bei 121 °C (1.5 bar, 20 min) sterilisiert. Für Festmedien wurde dem jeweiligen Medium 1.5 % (w/v) Agar Nr. 1 vor dem Autoklavieren zugesetzt. Das entsprechende Antibiotikum wurde den Medien nach dem Autoklavieren in den folgenden Endkonzentration zugefügt: Kanamycin 50 µg/mL und Ampicillin 100 µg/mL. Für die Anzucht von *Bacillus subtilis* wurden die Antibiotika in folgender Konzentration verwendet: Erythromycin 1 µg/mL, Lincomycin 25 µg/mL, Spectinomycin 25 µg/mL, Tetracyclin 20 µg/mL, Kanamycin 10 µg/mL.

3.4.1 LB-Medium

LB-Medium (*lysogeny broth*) wurde als Standardmedium für Klonierungsarbeiten und heterologe Expressionen in *E. coli* verwendet. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 10 M NaOH auf 7.0 gebracht.

LB-Medium	
Komponente	Menge
Hefeextrakt	5 g/L
Bactotrypton	10 g/L
NaCl	5 g/L

3.4.2 Difco-Sporulations(DSM)-Medium

Für die Lagerung von *Bacillus subtilis* wurden DSM-Agarplatten verwendet, welche die Sporulierung des Stammes begünstigen.

DSM-Medium	
Komponente	Menge
Nutrient Both	8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12 g/L
KCl	1 g/L
1 M NaOH	0.6 mL/L

3.4.3 2YT-Medium

2YT-Medium diente zur Anzucht der Kulturen von *Bacillus subtilis* und *licheniformis*, die für die Präparation von chromosomaler DNA verwendet wurden.

2YT-Medium	
Komponente	Menge
Hefeextrakt	10 g/L
Bactotrypton	16 g/L
NaCl	5 g/L

3.4.4 High salt- und Low salt-Medium

Zur Entwicklung der natürlichen Kompetenz und für die anschließende Transformation von *Bacillus subtilis* wurden High salt- (HS) und Low salt- (LS) Medium verwendet. Die dafür benötigte 10x S-Base wurde wie die übrigen Lösungen sterilfiltriert. LS-Medium wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt und sterilfiltriert.

10x S-Base	
Komponente	Menge
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	140 g/L
KH_2PO_4	60 g/L
$\text{Na}_3(\text{Citrat}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 g/L
1 M MgSO_4	1 ml/L

HS-Medium	
Komponente	Menge
10x S-Base	100 mL/L
50% (w/v) Glucose	10 mL/L
10% (w/v) Hefeextrakt	10 mL/L
2% (w/v) Caseinhydrolysat	10 mL/L
8% (w/v) Arginin/ 4% Histidin	100 mL/L
0.5% (w/v) Tryptophan	10 mL/L
0.3% (w/v) Phenylalanin	15 mL/L

LS-Medium	
Komponente	Menge
10x S-Base	100 mL/L
50% (w/v) Glucose	10 mL/L
10% (w/v) Hefeextrakt	10 mL/L
2% (w/v) Caseinhydrolysat	5 mL/L
50 mM Spermin	10 mL/L
0.5% (w/v) Tryptophan	10 mL/L
0.3% (w/v) Phenylalanin	15 mL/L
1 M MgCl_2	2.5 mL/L

3.4.5 Chromazurolsulfonat(CAS)-Agarmedium

Um die Sekretion von Siderophoren von *Bacillus subtilis* Stämmen zu detektieren, wurden CAS-Agarplatten verwendet.²⁰³ Die CAS-HDTMA-Stocklösung wurde wie in der Literatur beschrieben angesetzt.²⁰⁴ Nach Zugabe von 74.92 mL *ddH*₂O zu 100 mL BOC-Medium und Autoklavieren unter Zusatz von 1.2% (w/v) Agar Nr. 1 wurden folgende sterilfiltrierte Lösungen zugegeben, um 200 mL CAS-Agar-Medium zu erhalten:

0.2 M KH ₂ PO ₄	0.6 mL
1.0 M CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.4 mL
25 mM MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.08 mL
0.5 % (w/v) Glucose	2 mL
0.45 M Na-Glutamat	2 mL
CAS-HDTMA Stocklösung	20 mL (langsam unter Rühren zugeben)

2xBOC-Medium	
Komponente	Menge
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 mM
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.02 mM
Glucose	1% (w/v)
Na-Glutamat	9 mM

3.4.6 SpIII-Medium

Zur Produktion von Surfactin wurden *Bacillus subtilis* OKB105 und die verwendeten Deletionsmutanten in SpIII-Medium fermentiert. Die 10x T-Base und die Hefeextraktlösung wurden autoklaviert, die anderen Lösungen wurden sterilfiltriert. Anschließend wurde das SpIII-Medium wie folgt zusammengegeben und sterilfiltriert:

10x T-Base	100 mL/L
50% (w/v) Glucose	10 mL/L
1.2% (w/v) MgSO ₄	70 mL/L
10% (w/v) Hefeextrakt	10 mL/L
2% (w/v) Casaminoäuren	5 mL/L

10x T-Base	
Komponente	Menge
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	183 g/L
KH ₂ PO ₄	60g/L
Na ₃ (Citrat)·2H ₂ O	10g/L

3.5 Verwendete Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme von *Escherichia coli* für die heterologe Produktion von Proteinen verwendet. Daneben wurden verschiedene Stämme von *Bacillus subtilis* für *in vivo* Studien und zur Bereitstellung von genomischer DNA benötigt. Die Stämme *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) (DSM40783) und *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 dienen ausschließlich zur Präparation von genomischer DNA. Im folgenden sind die Besonderheiten und der Verwendungszweck der verschiedenen Stämme etwas näher ausgeführt.

3.5.1 *Escherichia coli* TOP10

Der Stamm *E. coli* TOP10 (Invitrogen) wurde standardmäßig zu Klonierungszwecken und zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen genutzt. Der Genotyp lautet:

F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(StrR) *endA1* *nupG* λ^- .

3.5.2 *Escherichia coli* 10-beta

Für die ortsgerichtete Mutagenese nach der QuickChange-Methode wurde dieser Stamm aufgrund seiner hohen Kompetenz zur Herstellung der Mutanten verwendet. Der Stamm verfügt über den folgenden Genotyp:

araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *fhuA* *lacX74* *galK16* *galE15* *mcrA* Φ 80*lacZ* Δ M15 *recA1* *relA1* *endA1* *nupG* *rpsL*(StrR) *rph* *spoT1* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*).

3.5.3 *Escherichia coli* BL21(DE3)

Dieser Stamm wurde aufgrund seiner Optimierung für Proteinstabilität zur Expression der rekombinanten Plasmide verwendet. Die Proteasen Lon und OmpT sind deletiert, wodurch die Halbwertszeit zellulärer Proteine erhöht und somit die Ausbeute des rekombinanten Proteins gesteigert wird. Desweiteren enthält der Stamm das Gen *lacI*, den *lacUV5*-Promotor und das Gen für die T7-Polymerase, was eine IPTG-induzierbare Transkription von plasmidkodierten Genen unter T7-Promotor-Kontrolle ermöglicht. Der Genotyp des Stamms ist:

F^- *ompT* *hsdS_B*(*r_B⁻ m_B⁻*) *gal* *dcm* λ (DE3 [*lacI* *lacUV5*-T7 *gene1* *ind1* *sam7* *nin5*]).

3.5.4 *Bacillus subtilis* MR168

Der Stamm *Bacillus subtilis* Marburg168 wurde bereits sequenziert²⁰⁵ und diente für die Präparation chromosomaler DNA. Aufgrund des inaktivierten Gens *sfp* produziert dieser Stamm keine NRPS-abhängigen Sekundärmetabolite wie Bacillibactin oder Surfactin. Eine Tryptophan-Auxotrophie kann als Selektionsmarker genutzt werden. Der Genotyp lautet: *trpC2 sfp*⁰.

3.5.5 *Bacillus subtilis* OKB105

Für *in vivo* Studien und die Generierung von Deletionsmutanten wurden dieser Stamm und weitere von diesem Stamm abgeleitete Knock-out-Mutanten verwendet. Es handelt sich dabei um einen Surfactin-produzierenden Stamm, der eine Phenylalanin-Auxotrophie besitzt und den folgenden Genotyp besitzt:¹⁵⁵ *pheA1 sfp*.

Die Deletionsmutanten von diesem Stamm wurden teilweise durch Dr. Melanie Wittmann im Rahmen ihrer Doktorarbeit hergestellt und sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tab. 3.4: In dieser Arbeit verwendete Deletionsmutanten von *B. subtilis* OKB105.

Name	Substituiertes Gen::Resistenzkassette	Herstellung
<i>B. subtilis</i> MW1	<i>yngI::tet</i>	Dr. Melanie Wittmann
<i>B. subtilis</i> MW2	<i>lcfA::mls</i>	Dr. Melanie Wittmann
<i>B. subtilis</i> MW3	<i>yhfT::spc</i>	Dr. Melanie Wittmann
<i>B. subtilis</i> MW5	<i>lcfA::mls yngI::tet</i>	Dr. Melanie Wittmann
<i>B. subtilis</i> MW6	<i>yngI::tet yhfT::spc</i>	Dr. Melanie Wittmann
<i>B. subtilis</i> MW8	<i>lcfA::mls yhfT::spc</i>	Dr. Melanie Wittmann
<i>B. subtilis</i> MW11	<i>lcfA::mls yhfT::spc yngI::tet</i>	Dr. Melanie Wittmann
<i>B. subtilis</i> FKR58	<i>yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit
<i>B. subtilis</i> FKR61	<i>lcfA::mls yhfT::spc yngI::tet yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit
<i>B. subtilis</i> FKR68	<i>lcfA::mls yngI::tet yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit
<i>B. subtilis</i> FKR69	<i>lcfA::mls yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit
<i>B. subtilis</i> FKR70	<i>lcfA::mls yhfT::spc yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit
<i>B. subtilis</i> FKR71	<i>yhfT::spc yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit
<i>B. subtilis</i> FKR72	<i>yngI::tet yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit
<i>B. subtilis</i> FKR73	<i>yngI::tet yhfT::spc yhfL::kan</i>	in dieser Arbeit

3.6 Die verwendeten Vektorsysteme pET28a(+) und pCB28a(+)

Die Vektoren pET28a(+) (Novagen) und pCB28a(+) wurden zur Überproduktion rekombinanter Proteine in *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Der Vektor pET28a(+) ermöglicht die Fusion des Zielproteins mit einem N- oder C-terminalen His₆-Tag, wodurch die Isolierung des Proteins mit Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht wird. Die Expressionsregionen des kodierenden DNA-Stranges werden von der T7-RNA-Polymerase transkribiert, die Regulation erfolgt über einen *lac*-Operator, der eine IPTG-induzierbare Expression ermöglicht. Der Vektor verfügt außerdem über eine Kanamycinresistenzkassette, welche die Verwendung von 50 µg/mL Kanamycin als Selektionsmarker ermöglicht.

Der Vektor pCB28a(+) ist ein leicht verändertes Derivat des Vektors pET28a(+), bei dem die Basenpaare 317-373 entfernt wurden, um den Linkerbereich zwischen dem N-terminalen His₆-Tag und der Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI zu verkürzen (Abb. 3.1).

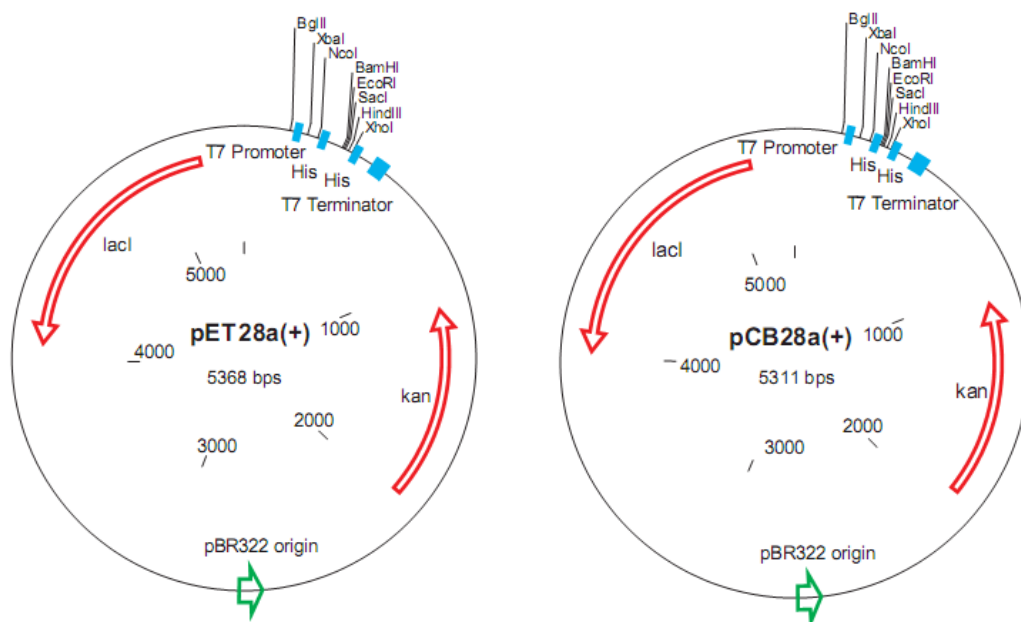


Abb. 3.1: Vektorkarten der Vektorsysteme pET28a(+) und pCB28a(+) mit den Schnittstellen ausgewählter Restriktionsendonukleasen.

3.7 Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind alle Oligonukleotide aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit für Klonierungen, ortsgerichtete Mutagenese oder zur Generierung von Deletionsmutanten verwendet wurden.

3 Verwendete Materialien

Tab. 3.5: Verwendete Oligonukleotide. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen in der Sequenz sind unterstrichen, eingeführte Mutationen sind durch Kleinbuchstaben angegeben.

Name	Sequenz	Restriktions- enzym	Vektor	Größe
5'-SrfAA-C1	AAAAAAGAATTTCATGGAAATAACTTTTAC CCTTTAAC	EcoRI	pCB28a(+)	1.3 kb
3'-SrfAA-C1	AAAAAAAGCTTTCAATCAGAAATCAGTGT TAATTCATC	HindIII		
5'-SrfAA-T1	AAAAAAGAATTTCGTCAGCGGCACTGCCTAT	EcoRI	pCB28a(+)	0.3 kb
3'-SrfAA-T1	AAAAAAAGCTTTTCATCTGTGATCAGCTTC CTCTG	HindIII		
5'-YhfT	AAAAAACCATGGTGACAATTACTCATACCT	NcoI	pCB28a(+)	1.4 kb
3'-YhfT	AAAAAAGGATCCTTATACTGTACACTCTCT	BamHI		
SrfAA-C1 H140A-1	GTTTTACGCAAATGTTTCATgCGTGATTTTC TGATGGTATG			1.3 kb
SrfAA-C1 H140A-2	CATACCATCAGAAATCACGgcATGAACATT TGCGTAAAAC			
SrfAA-C1 H139AH140A-1	GTGGTTTTACGCAAATGTTgCTgcCGTGAT TTCTGATGGTATGTC			1.3 kb
SrfAA-C1 H139AH140A-2	GACATACCATCAGAAATCACGgcAgcAACA TTTGCGTAAAACCAC			
SrfAA-C1 H139A-1	GTGGTTTTACGCAAATGTTTCATgCGTGAT TTCTGATGGTATGTCC			1.3 kb
SrfAA-C1 H139A-2	GGACATACCATCAGAAATCACGgcATGAAC ATTTGCGTAAAACCAC			
SrfAA-C1 H140D-1	CGCAAATGTTTCATgACGTGATTTCTGATG			1.3 kb
SrfAA-C1 H140D/K-2	TAAAACCACACTTCATTTTCCTTTATGGTG AAC			
SrfAA-C1 H140K-1	CGCAAATGTTTCATaAaGTGATTTCTGATGG			1.3 kb
ΔyhfL-P1	GTGCTCGAAGGTGTGAATCTCAAG			
ΔyhfL-P2	CCTCGGTATAATCTTACCTATCACCTTCTC CCACCCCTTAAGTGAATGAATAGT			
ΔyhfL-P3	CGCAACTGTCCATACTCTGATGTTTTATAA AATGAAAAAGCGAAGCGGTTAGCTTCG			
ΔyhfL-P4	CAACGGTCTGCAAAAACCGAAAAGG			
Kanamycin-1	AGGTGATAGGTAAGATTATAC			

Name	Sequenz	Restriktions- enzym	Vektor	Größe
Kanamycin-2	TAAAACATCAGAGTATGGACA			
5'-Cda-C1	AAAAAACCATGGTGTCTGAGAACTCTTCGG TTCGGCAC	NcoI	pCB28a(+)	1.3 kb
3'-Cda-C1	AAAAAACTCGAGGGTGGCTGCGGGGTCGGC	XhoI		
5'-DptA-PCP1	AAAAAACCATGGACGGCAAACCTGGACAGGG CGG	NcoI	pCB28a(+)	0.3 kb
3'-DptA-PCP1	AAAAAACTCGAGCAGCGGCGGGGTGGTGTG	XhoI		
Cda-C1H156A-1	ggcGACGCCCAGGTAGTACAGGTGCCG			1.3 kb
Cda-C1H156A-2	CACATCGTGATCGACGGCACCAGCATG			
Cda-C1H157A-1	ggcGTGGACGCCCAGGTAGTACAGGTGC			1.3 kb
Cda-C1H157A-2	ATCGTGATCGACGGCACCAGCATGGC			
5'-AcpK	AAAAAACCATGGATAAACAGAGAATCTTTG AAGTATT	NcoI		
3'-AcpK	AAAAAAGGATCCGCAGATTGCACTTTGTCA TA	BamHI	pCB28a(+)	0.3 kb
5'-BacA-Cy2	AAAAAACCATGGGCGACACTCTCGTGACAA GGGCT	NcoI		
3'-BacA-Cy2	AAAAAACTCGAGGGATACGGCTTTCTGGAT GACAGCG	XhoI	pET28a(+)	1.3 kb
5'-BacA-AT2	AAAAAACCATGGATGAAAAAAGCCGCCAAA TGATCAGCGC	NcoI		
3'-BacA-AT2	AAAAAACTCGAGAATCGGATGTTCCATATC GCTTTCTTCTCTG	XhoI	pET28a(+)	1.8 kb
5'-BacA-PCP1	AAAAAAGGATCCGGGGCGGAAAACGAATAT GAAGC	BamHI		
3'-BacA-PCP1	AAAAAACTCGAGTCAGTCGCCCTTGTCTTC TTGGTGA	XhoI	pET28a(+)	0.3 kb
BacA-Cy2 N275A-1	gcTTTAACCGTATTTAACAGAATCCCGTTT C			1.3 kb
BacA-Cy2 N275A-2	GATAGCAAAATGATTTTGCCGGCTC			
BacA-Cy2 S359A-1	gcCGTGCTGAGTGAAAATCCCGAC			1.3 kb
BacA-Cy2 S359A-2	TGTGAATACGATCGGCATGACCG			

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Anzucht von Mikroorganismen

Zur Klonierung der zu untersuchenden Gene aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* wurden die Stämme *B. subtilis* MR168 und *B. licheniformis* kultiviert und zur Präparation genomischer DNA verwendet. Dafür wurde eine Agar-Platte aus DSM-Medium hergestellt, der Stamm aus einem Glycerol-Stock darauf ausgestrichen und für einen Tag bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 mL 2YT-Medium mit einer Einzelkolonie der Platte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die ÜNK wurde dann zentrifugiert (5 min, 13000 rpm) und das Pellet für die Isolierung chromosomaler DNA verwendet.

4.1.2 Präparation genomischer DNA

Zur Amplifizierung der Gene, die im Rahmen dieser Arbeit benötigt wurden, wurde genomische DNA der Stämme *B. subtilis* MR168, *B. licheniformis*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) und *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 isoliert. Hierfür wurde ein Pellet einer ÜNK in 1 mL *ddH*₂O resuspendiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde erneut in 500 µL Lysepuffer (0.1 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM EDTA, 1% (w/v) SDS) resuspendiert und mit Glaskugeln (2.5 mm, säurebehandelt) auf ein Gesamtvolumen von etwa 1.25 mL aufgefüllt. Nach zweiminütigem Vortexieren wurde ein Loch mit Hilfe einer Kanüle in den Boden des Reaktionsgefäß gestochen und der Inhalt in ein frisches 1.5 mL-Reaktionsgefäß zentrifugiert (etwa zwei Sekunden). Zu der Lösung wurden 275 µL einer 7 M Ammoniumacetatlösung gegeben und es wurde 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurden 500 µL Chloroform hinzugefügt, es wurde gründlich geschüttelt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min mit 900 µL Isopropanol bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde 5 min bei 13000 rpm pelletiert, mit 200 µL 70% (v/v) Ethanol gewaschen (2 min, 13000 rpm) und 15 min bei 37 °C getrocknet. Abschließend wurde die chromosomale DNA in 100 µL *ddH*₂O gelöst und bei 4 °C gelagert.

4.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde ein leicht modifiziertes Protokoll nach Birnboim und Doly verwendet.²⁰⁶ Es wurden 2 mL einer ÜNK zentrifugiert (2 min, 13000 rpm) und das Pellet wurde in 300 µL P1 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 300 µL P2 (200 mM aq. NaOH, 1% (w/v) SDS) wurden 300 µL P3 (2.55 M aq. KOAc, pH 4.8) zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden per Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, 4 °C) abgetrennt und zu dem Überstand 600 µL Isopropanol zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 13000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit 200 µL 70% (v/v) Ethanol gewaschen (5 min, 13000 rpm, 4 °C) und bei 56 °C für 15 min getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 32 µL ddH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Für die Sequenzierung von Plasmiden wurde die DNA zusätzlich über die Bindung an Silicamatrizen mit dem *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) gereinigt. Dazu wurde mit dem Pellet aus 2 mL einer ÜNK nach Herstellerangaben verfahren.

4.1.4 Konstruktion der rekombinanten Expressionsplasmide

Die Herstellung von rekombinanten Plasmiden zur heterologen Produktion von Proteinen wurde mit gängigen Klonierungstechniken durchgeführt und ist in der Literatur ausführlich beschrieben.²⁰⁷ Im Folgenden wird daher nur kurz der standardisierte Ablauf angegeben.

Die Zielgene wurden aus genomischer DNA mit Hilfe von Polymerasekettenreaktionen (PCR) mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) und den in Tabelle 3.5 aufgeführten Oligonukleotiden amplifiziert. Die genauen Bedingungen wurden nach den Herstellerangaben der Polymerase abhängig von Größe des Gens, GC-Gehalt und Schmelztemperatur der Oligonukleotide festgelegt (Tab. 3.5). Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel (0.8% (w/v)) gelelektrophoretisch gereinigt und anschließend aus der Gelmatrix mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) isoliert. Inkubation mit entsprechenden Restriktionsenzymen (New England BioLabs) mit erneuter anschließender gelelektrophoretischen Reinigung und Geextraktion ermöglichte eine spezifische Ligation in das jeweilige linearisierte Vektorsystem. Dabei wurde die T4 DNA Ligase (New England BioLabs) nach Herstellerangaben verwendet. Elektrokompente *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen) wurden mit der Ligationslösung nach Dialyse bei 2.5 kV transformiert und die positiven Transformanten wurden auf

LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert. Die Plasmide wurden wie oben beschrieben isoliert und durch Restriktionskartierung und Sequenzierung (GATC Biotech) verifiziert. Transformation von *E. coli* BL21(DE3) Zellen (Invitrogen) mit den so identifizierten Plasmiden führte zum gewünschten, gentechnisch veränderten Expressionsstamm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch einige bereits vorhandene Konstrukte genutzt. Diese sind in Tabelle 3.6 aufgeführt und beschrieben.

Tab. 3.6: Bereits vorhandene Konstrukte, die in dieser Arbeit genutzt wurden.

Konstrukt	kodiertes Protein	hergestellt durch
pQE60_srfAA-M1	1. Modul der NRPS SrfAA	Dr. Kathrin Eppelmann
pQE60_lcfA	Acyl-CoA-Ligase (<i>B. subtilis</i>)	Dr. Melanie Wittmann
pBAD102_yhfL	Acyl-CoA-Ligase aus (<i>B. subtilis</i>)	Dr. Melanie Wittmann
pBAD102_yngI	Acyl-CoA-Ligase aus (<i>B. subtilis</i>)	Dr. Melanie Wittmann
pQE60_srf-TEII	externe Thioesterase (<i>B. subtilis</i>)	Dr. Dirk Schwarzer
pQTev_CDA-ACP	ACP aus dem CDA-Gencluster (<i>S. coelicolor</i> A3(2))	Dr. Florian Kopp
pET28a(+)_hxcO	HxcO aus dem CDA-Gencluster (<i>S. coelicolor</i> A3(2))	Dr. Florian Kopp
pET28a(+)-hcmO	HcmO aus dem CDA-Gencluster (<i>S. coelicolor</i> A3(2))	Dr. Florian Kopp

4.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden in dieser Arbeit mit der QuickChange-Methode (Stratagene) oder mit Hilfe einer *blunt-end*-Ligation eingeführt. Bei der QuickChange-Methode werden zwei etwa 35 bp lange, komplementäre Oligonukleotide verwendet, welche die gewünschte Punktmutation in der Mitte der Sequenz tragen. Durch PCR mit der Phusion High-Fidelity Polymerase (New England BioLabs) wurde das Ausgangsplasmid amplifiziert und nach gelelektrophoretischer Reinigung und Gelextraktion mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* inkubiert, um methylierte Templat-DNA zu hydrolysieren. Anschließend wurden ultrakompetente *E. coli* 10-beta-Zellen (New England BioLabs) mit dem Ansatz nach Herstellerprotokoll transformiert. Die Plasmide der positiven Transformanten wurden mit Hilfe von Restriktionskartierung und Sequenzierung (GATC Biotech) verifiziert. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit der

Plasmidlösung.

Für eine *blunt-end*-Ligation wurden 5'-phosphorylierte Oligonukleotide verwendet, von denen ein Primer die gewünschte Modifikation am 5'-Ende enthielt. Der dazu komplementäre Primer wurde so gewählt, dass die Amplifikation zum linearisierten Konstrukt ohne Sequenzverlust führte. Nach dem wie oben beschriebenen Verdau mit *DpnI* zur Entfernung des Templots wurde eine intramolekulare Ligation mit der T4 DNA Ligase (New England BioLabs) durchgeführt und dann wie bei der QuickChange-Methode weiter verfahren.

4.1.6 Deletionsmutanten in *Bacillus subtilis*

Um selektive Deletionsmutanten von *Bacillus subtilis* zu generieren, wurde das zu deletierende Gen *yhfL* im Genom durch eine Kanamycinresistenzkassette substituiert. Dazu wurde die Resistenzkassette an beiden Enden mit etwa 1000 bp langen Sequenzen fusioniert, die das Zielgen flankieren.²⁰⁸ Diese PCR-Synthese wurde mit den in Tabelle 3.5 angegebenen Oligonukleotiden durchgeführt. Um die homologe Rekombination in *B. subtilis* zu ermöglichen, wurde der gewünschte Stamm mit dem Fusions-PCR-Produkt transformiert. Dazu wurden zunächst 5 mL HS-Medium mit einer Einzelkolonie von *B. subtilis* MR168 inokuliert und über Nacht angezogen. Dann wurde diese ÜNK zur Inokulation von 20 mL LS-Medium verwendet (1:40 v/v) und es wurde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0.5 erreicht hatte. Die Kultur wurde zu 1 mL aliquotiert, mit 10, 50 oder 100 ng PCR-Produkt versetzt und für weitere 2 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Ansätze wurden auf LB-Agarplatten mit 50 µg/mL Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformanten wurden mittels PCR des deletierten Genbereichs und Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigt.

Da der Stamm *B. subtilis* MR168 ein Sfp-defizienter und somit Surfactin-defizienter Stamm ist, wurde von den generierten Deletionsmutanten die chromosomale DNA präpariert und diese erneut für eine Transformation mit dem Surfactin-Produzenten *B. subtilis* OKB105 genutzt. Um sicherzustellen, dass bei dieser Transformation nicht das Gen für die 4'-Phosphopantetheinyltransferase Sfp deletiert wurde, wurden die Transformanten auf CAS-Agarplatten ausgestrichen, auf denen die Produktion von eisenbindenden Verbindungen wie Siderophoren überprüft werden kann, deren Biosynthese abhängig von Sfp ist.

4.2 Proteinchemische Methoden

4.2.1 Heterologe Genexpression

Die erstellten Konstrukte wurden zunächst für eine Genexpression im analytischen Maßstab verwendet, um Klone zu selektieren, die eine besonders gute Proteinproduktion aufwiesen. Dafür wurde eine 4 mL ÜNK aus einer Einzelkolonie des entsprechenden Expressionsstammes hergestellt und für die Inokulation von 4 mL LB-Medium (1:100 v/v) verwendet. Die Kultur wurde bis zu einer $OD_{600} = 0.6$ bei 37 °C und 250 rpm angezogen und dann in 2 mL Portionen geteilt. Die eine Hälfte wurde mit einer Endkonzentration von 0.5 mM IPTG versetzt und zusammen mit den Kontrollen weitere 2 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Dann wurde je 1 mL der induzierten und nichtinduzierten Kulturen entnommen, zentrifugiert (2 min, 13000 rpm) in 100 µL *ddH*₂O resuspendiert und mit 33 µL 4x SDS-Probenpuffer (500 mM Tris/HCl pH 6.8, 5 mg/L Bromphenolblau, 20% (w/v) β-Mercaptoethanol, 40% (v/v) Glycerol, 8% (w/v) SDS) versetzt. Über eine SDS-PAGE wurden die Proben analysiert und ein Klon gewählt, der eine hohe Proteinproduktion aufwies.

Für Gene, die im präparativen Maßstab exprimiert wurden, wurden 2.5 oder 5 L LB-Medium aliquotiert auf 500 mL mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt und mit einer ÜNK des Expressionsstammes im Verhältnis 1:100 (v/v) inokuliert. Es wurde bei 30 °C und 220 rpm inkubiert, bis die Kulturen eine OD_{600} von etwa 0.2 erreicht hatten. Dann wurde die Temperatur schrittweise auf 18 °C gesenkt und bei einer OD_{600} von 0.6 wurden die Kulturen mit 0.1 mM IPTG induziert und für ca. 16 h bei 18 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 20 min, 4 °C) geerntet und das Pellet in Puffer A (50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 8.0) resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.2 Zellaufschluss

Für eine analytische Reinigung der Zielproteine erfolgte der Aufschluss mit Lysozym (1 mg/mL Endkonzentration, 30 min auf Eis) und Ultraschall. Dazu wurde das resuspendierte Pellet dreimal mit jeweils 10 Pulsen der Leistungsstufe 4 behandelt und dabei auf Eis gehalten.

Präparativ wurde das in kaltem Wasserbad aufgetaute Zellpellet durch Kavitationskräfte mit Hilfe einer French Press aufgeschlossen, wobei ein Druck von 1100 psi (75.9 bar) verwendet wurde.

Die Zelltrümmer und unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (30 min, 17000 rpm,

4 °C) abgetrennt und der Überstand wurde direkt für die Reinigung des rekombinanten Proteins weiter verwendet.

4.2.3 Proteinreinigung über Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Bei der Isolierung der rekombinanten Proteine wurde die Fusion an einen His₆-Tag ausgenutzt, indem die Histidinreste an Ni²⁺ binden, das immobilisiert über Nitrilotriacetat(NTA)-Liganden an einer Agarosematrix vorliegt. Dafür wurde die Ni-NTA-Säule zunächst mit 3% Puffer B (Puffer A: 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 8.0 und Puffer B: 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0) an einem FPLC-System äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand des Lysats mit einer Flussrate von 0.7 mL/min und 3% Puffer B aufgetragen und die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumen gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 3-50% Puffer B über 30 min und einer Flussrate von 1 mL/min, gefolgt von einem Gradienten auf 100% in 10 min. Die 2 mL Fraktionen wurden mittels qualitativem Bradford-Test (s. 4.2.6.1) auf Proteingehalt getestet und über SDS-PAGE nach Laemmli²⁰⁹ analysiert. Die Fraktionen des Zielproteins wurden vereinigt und über Ultrakonzentratoren ankonzentriert. Es folgte entweder eine Entsalzung oder eine Größenausschlusschromatographie als weiterer Aufreinigungsschritt.

4.2.4 Proteinreinigung über Größenausschlusschromatographie

Als weiterer Aufreinigungsschritt wurde in manchen Fällen nach der IMAC eine Größenausschlusschromatographie gewählt. Dafür wurden für Proteine mit einem größeren Molekulargewicht von 70 kDa Sephadex 200 Säulen (GE Healthcare) und für Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht Sephadex 75 Säulen verwendet. Diese wurden zunächst mit zwei Säulenvolumen Wasser und zwei Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer (10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7.0) äquilibriert. Im Anschluss wurde die ankonzentrierte Proteinlösung aufgetragen, gefolgt von einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer mit einer Flussrate von 1 mL/min. Es wurden 2 mL Fraktionen gesammelt, deren Absorption per UV-Detektion bei 280 nm aufgezeichnet wurde. Fraktionen der angezeigten Peaks wurden mit SDS-PAGE analysiert und entsprechende Fraktionen wurden vereinigt und über Ultrakonzentratoren eingeeengt. Die Proteinkonzentration wurde über die Absorption bei 280 nm oder mittels BC-Assay ermittelt. Das Protein wurde in 20-100 µL Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.5 Proteinentsalzung über Hi-Trap™-Entsalzungssäulen

Proteine, die nach der IMAC eine hohe Reinheit aufwiesen, wurden über eine Hi-Trap™-Entsalzungssäule dialysiert. Auf diese wurde nach Äquilibration mit zwei Säulenvolumen Dialysepuffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) die Proteinlösung mit 2 mL/min aufgetragen gefolgt von einem Säulenvolumen Dialysepuffer. Die proteinhaltenden Fraktionen wurden mit qualitativem Bradford-Test identifiziert, vereinigt und wie in 4.2.4 beschrieben behandelt.

4.2.6 Photometrische Protein-Nachweise

4.2.6.1 Qualitativer Nachweis mittels Bradford-Test

Zur qualitativen Identifizierung von proteinhaltigen Fraktionen wurde ein Farbnachweis mit Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Bradford gewählt.²¹⁰ Dafür wurden zu 100 µL Bradfordlösung (5% (w/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure, 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) in einer Mikrotiterplatte 10 µL der zu analysierenden Lösung zugegeben. In Anwesenheit von Proteinen färbt sich die rötliche Lösung aufgrund von Komplexbildung des Farbstoffs mit Seitenketten des Proteins blau.

4.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Absorption bei 280 nm

Die Proteinkonzentration von rekombinanten Proteinen wurde ab einem Molekulargewicht von 15 kDa durch Absorptionsmessung bei 280 nm mit Hilfe eines Nanodrop-Photometers bestimmt.

Tab. 3.7: ϵ_{280} der verwendeten rekombinanten Proteine.

Protein	ϵ_{280} / $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
SrfAA-C1	54.98
SrfAA-M1	96.16
Cda-C1	41.04
HxcO	60.73
HcmO	64.38
BacA-Cy2	56.14
BacA-AT2	63.37
BacA-PCP1	6.97

Der Extinktionskoeffizient ε_{280} hängt hierbei hauptsächlich von aromatischen Seitenketten ab und lässt sich aus der Sequenz berechnen. Die mit dem Programm DNA Star bestimmten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

4.2.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung durch den Bicinchoninsäure-Assay

Für Proteine mit keinen oder sehr wenigen aromatischen Seitenketten ist die Bestimmung über UV-Absorption bei 280 nm ungeeignet. Für diese Proteine wurde ein BC-Assay Kit (Uptima Interchim) verwendet, bei dem Cu^{2+} -Ionen durch Peptidbindungen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden, die mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm bilden. Der Assay wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt, die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Kalibration mit BSA (Abb. 4.1).

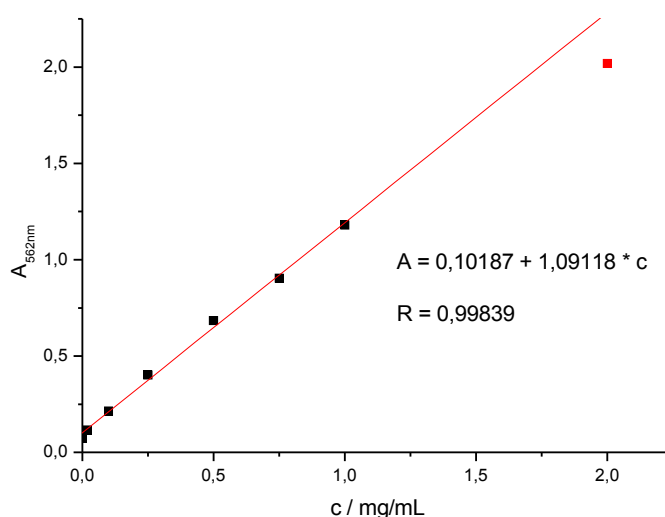


Abb. 4.1: Kalibrationsgerade des BC-Assays mit BSA. Der rot markierte Wert liegt außerhalb des Linearitätsbereichs und wurde zur Erstellung der Ausgleichsgerade nicht berücksichtigt.

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Produkte aus chemischen Synthesen wurden über ESI-MS identifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist eine schnelle Analyse, für die nur wenig Substanz benötigt wird und ein Ionisationsvorgang, der

außerdem eine Detektion von thermisch labilen Substanzen erlaubt. Dafür wurden die Proben in 90% Laufmittel B (Laufmittel A: 0.1% TFA in *ddH*₂O und Laufmittel B: 0.1% TFA in Acetonitril) aufgenommen und in ein ESI-Massenspektrometer injiziert. Die Detektion erfolgte für fünf Minuten nach Injektion im positiven Scan-Modus (100-1000 m/z).

4.3.2 Peptidmassen-Fingerabdruck

Um die Identität der gereinigten, rekombinanten Proteine zu bestätigen, wurde das Protein aus einer Bande eines SDS-Polyacrylamidgels extrahiert und mit Trypsin spezifisch hydrolysiert. Dazu wurde der ausgeschnittenen Gelbande 200 µL Waschlösung (200 mM NH₄HCO₃, 50% (v/v) CH₃CN) zugegeben, bei 37 °C 30 min inkubiert und anschließend mittels einer Vakuumzentrifuge wieder getrocknet (30 °C, 30 min). Der tryptische Verdau des Proteins wurde innerhalb der Gelbande durch Zugabe von 20 µL Trypsin-Lösung (0.02 µg/µL Trypsin, 10% NH₄HCO₃, 10% (v/v) CH₃CN, pH 8.1) durchgeführt. Nach Inkubation bei 37 °C für 45 min wurde die überschüssige Trypsin-Lösung entfernt und für weitere 16 h inkubiert. Durch Zugabe von 25 µL Diffusionslösung (1% (v/v) TFA, 10% (v/v) CH₃CN, pH 8.1) wurden die Peptidfragmente unter Ultraschallbehandlung (45 min, RT) aus der Gelbande eluiert. Durch Massenspektrometrie an einem Nano-Spray-HPLC-QTOF-MS-Systems wurden die Peptidfragmente detektiert und das Protein wurde durch Abgleich des entstandenen Peptidmassen-Fingerabdruck mit der MASCOT-Datenbank identifiziert.²¹¹ In den meisten Fällen erfolgten diese Arbeitsschritte durch die Massenspektrometrie-Abteilung der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Dr. Uwe Linne.

4.3.3 HPLC-MS

Zur Analyse von *in vitro* Assays wurde in fast allen Fällen HPLC-MS durchgeführt, um die Substrate und Produkte in biochemischen Assays zu identifizieren. Dazu wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand automatisiert auf eine *reversed phase* Säule (Macherey & Nagel) injiziert. Nach Trennung über HPLC an einem Hewlett Packard Series 1100 HPLC-System erfolgte die Detektion der Eluenten über Messung der UV-Absorption bei 214 nm und einer ESI-MS-Einheit (Agilent 1100 MSD). Die genauen Bedingungen wie Säulenart, Laufmittel und Gradienten sind in den jeweiligen Abschnitten zur Durchführung der Assays angegeben (s. 4.4 und 4.6).

4.4 Extraktion von Surfactin

Aus den Kulturen der Stämme *Bacillus subtilis* OKB105 und der in dieser Arbeit verwendeten Deletionsmutanten dieses Stamms wurde der Sekundärmetabolit Surfactin nach der Methode von Nakano *et al.* extrahiert.¹⁵⁵ Dafür wurde zunächst eine 4 mL ÜNK des entsprechenden Stammes in LB-Medium angefertigt, von der 200 μ L zur Inokulation von 20 mL SpIII-Medium genutzt wurden. Dann wurde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis die Kulturen eine OD₆₀₀ von etwa 1.5 erreicht hatten. Anschließend wurden 2 mL entnommen und zentrifugiert (3 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde mit 500 μ L *n*-Butanol versetzt und gut gemischt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 25 °C und 400 rpm geschüttelt und anschließend 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und auf Eis gelagert. Die untere wässrige Phase wurde noch zweimal auf die gleiche Weise mit 500 μ L *n*-Butanol extrahiert, die organischen Phasen wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C getrocknet. Der Rückstand wurde in 50 μ L 70% Methanol gelöst, zentrifugiert und über HPLC-MS analysiert. Dafür wurde eine Nucleosil C18 250/3 Säule bei 45 °C mit einer Flussrate von 0.3 mL/min und einem Gradienten von 70-90% Laufmittel B (Laufmittel A: 0.05% Ameisensäure in H₂O; Laufmittel B: 0.045% Ameisensäure in Methanol) in 30 min verwendet. Dann wurde für 10 min 95% Laufmittel B gehalten und die Säule anschließend auf 70% Laufmittel B äquilibriert. Die Detektion und Identifizierung erfolgte über UV-Absorption bei 214 nm und MS-Analyse im Scan-Modus von 450-1200 m/z. Zur Quantifizierung wurden die entsprechenden UV-Signale integriert und der Flächeninhalt durch den Wert der OD₆₀₀ der jeweiligen Kultur dividiert, um die Ergebnisse unterschiedlicher Extraktionen vergleichen zu können.

4.5 Chemische Synthesen

4.5.1 Synthese von Aminoacyl-CoA-Derivaten

Die Synthese von Aminoacyl-CoA-Thioestern erfolgte über die Kupplung mit dem Kupplungsreagenz PyBOP. Dazu wurden 50 μ mol (1.0 äq.) der N_α-Boc- und seitenkettengeschützten Aminosäure, 75 μ mol (1.5 äq., 61.6 mg) Trilithium-Coenzym A und 75 μ mol (1.5 äq., 39.0 mg) PyBOP in 2 mL DMF/H₂O (4:1, v/v) unter Zuhilfenahme von Ultraschall gelöst. Dann wurden 500 μ mol (10.0 äq., 85.07 μ L) DIPEA zugegeben und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung

schockgefroren und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 1.5 mL Entschüttungslösung (TFA/TIPS/H₂O, 95:2.5:2.5, v/v/v) aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Lösung erneut gefriergetrocknet und der Rückstand in 4 mL *dd*H₂O gelöst. Die Suspension wurde sterilfiltriert und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde das Filtrat mit 18 mL/min auf eine *reversed phase* Säule (Nucleodur C18 Htec, 250/21 5 µm, Macherey & Nagel) aufgetragen und ein Gradient von 0-30% Laufmittel B (Laufmittel A: 0.1% TFA in *dd*H₂O; Laufmittel B: 0.1% TFA in Acetonitril) in 30 min appliziert. Nach Erhöhung auf 95% Laufmittel B in 2 min wurde 5 min bei 95% Laufmittel B gehalten und abschließend die Säule wieder auf 0% Laufmittel B äquilibriert.

Die Eluenten wurden bei 214 nm durch eine UV-Einheit detektiert und in 9 mL Fraktionen gesammelt. Die zugehörigen Fraktionen der UV-Signale wurden massenspektrometrisch mittels ESI-MS (s. 4.3.1) untersucht und die identifizierten Produkt-Fraktionen vereinigt und gefriergetrocknet. Tabelle 3.8 zeigt die so synthetisierten Produkte, die beobachteten Retentionszeiten sowie die zugehörigen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse.

Tab. 3.8: Synthetisierte Aminoacyl-CoA-Thioester und deren beobachtete Werte für *m/z* und Retentionszeiten.

Produkt	Retentionszeit <i>t_R</i>	[M+H] ⁺ _{exp.}	[M+H] ⁺ _{theor.}	[M+2H] ²⁺ _{exp.}	[M+2H] ²⁺ _{theor.}
GluCoA	14.1 min	897.0	897.2	449.0	449.1
LeuCoA	17.0 min	881.0	881.2	441.0	441.1
SerCoA*	13.3 min	855.0	855.1	428.0	428.1
ThrCoA	15.3 min	869.0	869.2	435.0	435.1

*Synthesevorschrift nach 4.5.2.2, HPLC-Reinigung nach 4.5.1

4.5.2 Synthese von Acyl-CoA-Derivaten

4.5.2.1 Synthese von 3-Hydroxymyristinsäure-CoA

3-Hydroxymyristinsäure wurde mit einem etwas veränderten Protokoll von Blecher *et al.* und Hiramoto *et al.* über einen *N*-Hydroxysuccinimidester an CoA gekuppelt.²¹²⁻²¹³

Zu einer Lösung von 116 mg (1 mmol, 1 äq.) *N*-Hydroxysuccinimid in 5 mL trockenem EtOAc wurden 244 mg (1 mmol, 1 äq.) 3-Hydroxymyristinsäure in 1 mL trockenem EtOAc hinzugegeben. Zum Lösen aller Komponenten wurde das Reaktionsgemisch in einem Wasserbad auf 50 °C erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung von 206 mg (1 mmol, 1 äq.) DCC in EtOAc hinzugefügt und über

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der von Harnstoff gebildete weiße Niederschlag abfiltriert und mit EtOAc gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der weiße Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Zur Synthese des CoA-Derivats der 3-Hydroxymyristinsäure wurden 50 mg (147 μmol , 1 äq.) *N*-Hydroxysuccinimid-Fettsäureester in 2 mL THF gelöst und zu einer Lösung von 60 mg (73 μmol , 0.5 äq.) Coenzym A (Lithiumsalz) in 3 mL *ddH*₂O gegeben. Es wurde bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt (*n*-Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:3, $R_f = 0.6$). Nach 4.5 h wurde die Lösung mit 87 mg Natriumbicarbonat in 2 mL *ddH*₂O neutralisiert. Um eine Phasentrennung zu vermeiden, wurden zusätzlich 2 mL THF hinzugefügt.

Das Produkt wurde durch Zugabe von 12 mL 5%iger Perchlorsäure gefällt. Um eine vollständige Fällung zu erreichen, wurden die organischen Lösungsmittel am Rotationsverdampfer aus dem Gemisch entfernt. Der weiße Niederschlag wurde durch Zentrifugation (10 min, 4000 upm) von der wässrigen Phase getrennt. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 5 mL 0.8%iger Perchlorsäure gewaschen und jeweils durch erneute Zentrifugation (10 min, 4000 upm) abgetrennt. Anschließend wurde einmal mit 10 mL Aceton und zweimal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Der weiße Rückstand wurde in 2 mL Wasser gelöst. Aus der wässrigen Lösung wurde das Produkt erneut mit 3 mL 5%iger Perchlorsäure gefällt und per Zentrifugation (10 min, 4000 upm) pelletiert. Der Rückstand wurde noch zweimal mit 0.8%iger Perchlorsäure und dreimal mit jeweils 5 mL Aceton gewaschen. Anschließend wurde der weiße Feststoff in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Lyophilisation getrocknet. Die Identifizierung erfolgte mittels ESI-MS (s. 4.3.1).

4.5.2.2 Synthese von Hexanoyl- und 2-Hexenoyl-CoA

Für die Kupplung von Hexan- und 2-Hexensäure an CoA wurde ein etwas verändertes Protokoll als in 4.5.1 beschrieben verwendet. 0.1 mmol (2.0 äq.) der Fettsäure, 0.05 mmol (1.0 äq., 41.07 mg) Trilithium-Coenzym A, 0.08 mmol (1.6 äq., 41.63 mg) PyBOP und 0.2 mmol (4 äq., 27.64 mg) K₂CO₃ wurden in 2 mL THF/H₂O (1:1, v/v) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Lyophilisation wurde der Rückstand in 1 mL *ddH*₂O gelöst, filtriert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurde eine *reversed phase* Säule (Nucleodur C18 Htec, 250/21 5 μm , Macherey & Nagel) mit einer Flussrate von 20 mL/min mit einem Gradienten von 5-70% Laufmittel B (Laufmittel A: 0.1% TFA in *ddH*₂O; Laufmittel B: 0.1% TFA in Acetonitril) in 30 min verwendet. Nach Erhöhung auf 95% Laufmittel B innerhalb von 10 min wurde für 2 min bei 95% Laufmittel B

gehalten und die Säule anschließend mit 5% Laufmittel B äquilibriert. Es wurden 10 mL Fraktionen gesammelt. Mittels Messung der UV-Absorption bei 214 nm wurden die Eluenten detektiert und mit ESI-MS identifiziert (Tab. 3.9). Produkt-Fractionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Tab. 3.9: Synthetisierte Acyl-CoA-Thioester und deren beobachtete Werte für m/z und Retentionszeiten.

Produkt	Retentionszeit t_R	$[M+H]^+_{exp.}$	$[M+H]^+_{theor.}$	$[M+2H]^{2+}_{exp.}$	$[M+2H]^{2+}_{theor.}$
Hexanoyl-CoA	17.7 min	866.0	866.2	433.6	433.6
Hexenoyl-CoA	18.3 min	864.2	864.2	432.6	432.6

4.5.3 Synthese von Amino-CoA

Amino-Coenzym A kann aus Pantothersäure über eine Kombination aus chemischer Synthese und enzymkatalysierter Reaktionen in wenigen Stufen dargestellt werden. Der Syntheseweg ist in Abb. 4.2 dargestellt.

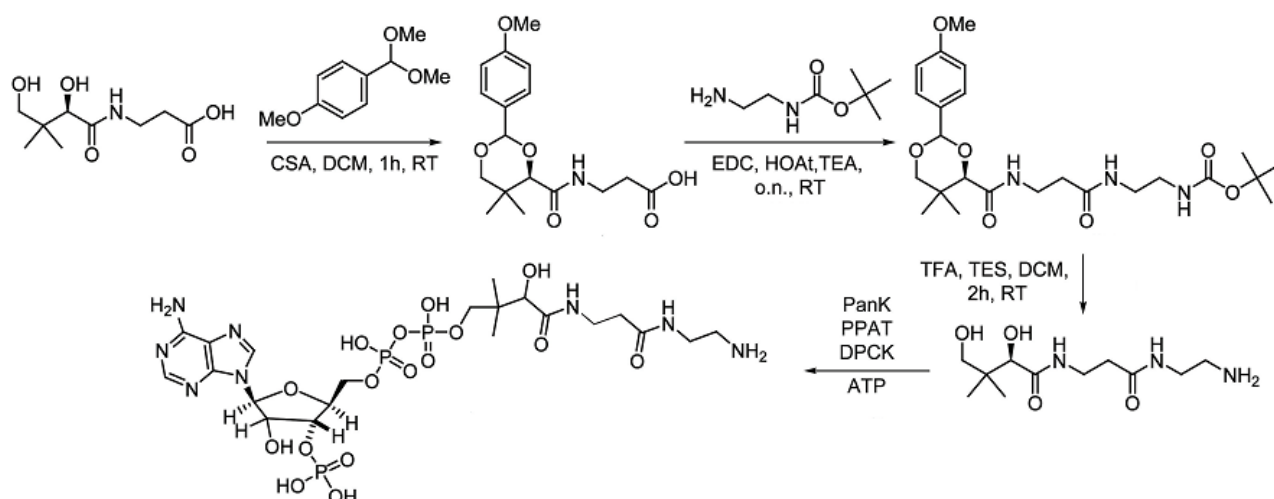


Abb. 4.2: Darstellung von Amino-CoA aus Pantothersäure.

Darstellung von Pantothersäure: 20 g (83.94 mmol) D-Pantothersäure Hemicalciumsalz wurden in 200 mL dH₂O gelöst. Die Lösung wurde mit ca. 40 mL 4 M HCl auf pH 3.0 gebracht. Anschließend wurde die Lösung zehnmal mit je 200 mL Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und Pantothersäure wurde als klares Öl (12.68 g, 57.84 mmol, 69%) erhalten.

Acetalschützung von Pantothersäure: 10.21 g (46.79 mmol, 1.0 äq.) Pantothersäure wurden mit 100 mL Dichlormethan (DCM) versetzt und 7.98 mL (46.79 mmol, 1.0 äq.)

p-Anisaldehyddimethylacetal (PADA) zur Emulsion gegeben. Nach Zugabe von 1.09 g (4.8 mmol, 0.1 äq.) \pm -Campher-10-sulfonsäure (CSA) trat eine zügige Vermischung der Emulsion ein und die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (500 mL Kieselgel 60 in Hexan/EtOAc (6:1, + 0.1% Ameisensäure), gefolgt von steigender EtOAc-Konzentration bis hin zu reinem EtOAc). Die Elutionsfraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf enthaltenes Produkt getestet (Hexan/EtOAc 3:2 + 0.1% Ameisensäure; R_f = 0.06). Zum Anfärben der Substanzen wurde eine Cer-Molybdän-Färbelösung verwendet (5 g Ammoniummolybdat, 0.1 g Cer(IV)sulfat, 100 mL 10% Schwefelsäure). Es wurden 6.64 g (19.77 mmol, 42%) Produkt erhalten.

ESI-MS: $[M+Na]^+ = 360.1527$; berechnete Masse $[M+Na]^+ = 360.1425$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.40 (d, J = 8.69 Hz, 2H); 6.92 (d, J = 8.80 Hz, 2H); 5.46 (s, 1H); 4.10 (s, 1H); 3.81 (s, 3H); 3.67 (q, J = 11.52 Hz, 2H); 3.52 (dq, J = 13.86 Hz, 8.22 Hz, 2H); 2.61 (t, J = 6.24 Hz, 2H); 1.10 (s, 3H).

Darstellung von geschütztem Aminopantethein: 3.00 g (8.89 mmol, 1.0 äq.) der acetalgeschützten Pantothersäure, 3.23 g (17.78 mmol, 2.0 äq.) *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und 29.39 mL (17.78 mmol, 2.0 äq.) einer 0.6 M 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) in DMF wurden zusammengegeben. Unter Rühren wurden 1.44 mL (8.89 mmol, 1.0 äq.) *N*-Boc-Ethylendiamin zugegeben, anschließend wurde über zwei Stunden zu der klaren, gelben Lösung unter starkem Rühren 3.72 mL (26.68 mmol, 3.0 äq.) Triethylamin zugetropft, wobei eine leichte Trübung der Lösung eintrat. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum bei 40 °C entfernt (ca. 5 mbar). Der Destillationsrückstand wurde in 30 mL EtOAc und 20 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung gelöst. Die organische Phase wurde noch einmal mit 20 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung und zwei mal mit 20 mL gesättigter NaCl -Lösung extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das gelbe, ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (500 mL Kieselgel 60 in Hexan/EtOAc (6:1), gefolgt von steigender EtOAc-Konzentration bis hin zu reinem EtOAc). Die Produktfraktionen wurden mit Hilfe von DC identifiziert (Hexan/EtOAc 3:2, R_f = 0.053, Färbung mit Cer-Molybdän-Färbelösung). Es wurden 3.64 g (7.5 mmol, 67%) geschütztes Aminopantethein erhalten.

4 Methoden

ESI-MS: $[M+H]^+ = 480.2708$; $[M+Na]^+ = 502.2515$; berechnete Masse $[M+H]^+ = 480.2632$; $[M+Na]^+ = 502.2532$.

Entschützung von Aminopantethein: 7.89 g (16.45 mmol, 1.0 äq.) des geschützten Aminopantetheins wurden in 100 mL DCM gelöst und mit 12.80 mL (164.5 mmol, 10 äq.) TFA und 13.15 mL (82.25 mmol, 5.0 äq.) TES versetzt. Nach vierstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingeeengt und anschließend gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 110 mL *ddH*₂O (0.1% TFA) resuspendiert. Die Lösung wurde nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) mit Hilfe einer präparativen HPLC gereinigt (je 2 mL Injektionsvolumen, 10 mL/min Flussrate, Nucleodur C18-Säule 250/21 5 μ m, Laufmittel A: *ddH*₂O mit 0.1% TFA, Laufmittel B: Acetonitril mit 0.1% TFA). Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 0% auf 60% B in 30 min ($t_R = 13.1$ min) und die Produktfraktionen wurden per UV-Detektion und anschließender Massenspektrometrie ermittelt, vereinigt und gefriergetrocknet. Es wurden 3.19 g (12.21 mmol, 74%) Aminopantethein erhalten.

Enzymatische Umsetzung von Aminopantethein zu Amino-Coenzym A: Der letzte Schritt der Amino-CoA-Synthese verläuft über eine enzymatische Umsetzung und wird in kleineren Maßstäben durchgeführt als die chemische Synthese von Aminopantethein. Die Zusammensetzung einer solchen enzymatischen Darstellung ist in Tabelle 3.10 angegeben.

Tab. 3.10: Menge eingesetzter Chemikalien zur enzymatischen Darstellung von Amino-CoA.

Verbindung	MW / g mol ⁻¹	Stoffmenge / μ mol	Äquival.	Einwaage
Aminopantethein	261.4	95.64	1.0	25 mg
PanK, 339 μ M (Panhotenat-Kinase, EC 2.7.1.33)	36360	0.24	0.00250	708 μ L
PPAT, 314 μ M (Pantetheinphosphat- Adenylyltransferase, EC 2.7.7.3)	17836	0.36	0.00375	1146 μ L
DPCK, 340 μ M (Dephospho-CoA-Kinase, EC 2.7.1.24)	22621	0.48	0.00500	1412 μ L
ATP (0.1 M)	551.14	956.4	10	9.564 mL
MgCl ₂ (3 M)	95.21	1912.8	20	638 μ L
KCl (3 M)	74.55	1912.8	20	638 μ L
Tris/HCl (1 M, pH 9.0)	121.14			869 μ L

Alle in Tabelle 3.10 aufgeführten Komponenten wurden in einem 50 mL Reaktionsgefäß vereint und für 1.5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über eine Sep-Pak® C18-Säule (Waters) entsalzt und von den Enzymen getrennt. Die Säule wurde zuvor mit 10 mL Acetonitril gefolgt von 10 mL ddH₂O äquilibriert. Nach Auftragen des Reaktionsgemisches wurde mit 5 mL ddH₂O gewaschen und mit 6 mL 0.1% TFA-haltigem Gemisch (Acetonitril/ddH₂O 1:1) eluiert. Das Eluat wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Rückstand in 2 mL ddH₂O mit 0.1% TFA aufgenommen und nach Filtration mit Hilfe von präparativer HPLC gereinigt (18 mL/min Flussrate, Nucleodur C18-Säule 250/21 5 µm, Laufmittel A: ddH₂O mit 0.1% TFA, Laufmittel B: Acetonitril mit 0.1% TFA). Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 0-10% Laufmittel B in 20 min und die Produktfraktionen wurden mittels UV-Detektion und ESI-MS ermittelt, vereinigt und lyophilisiert. Es wurden 20.3 mg (27 µmol, 28%) Amino-CoA und zusätzlich 5.1 mg Dephospho-Amino-CoA (7.6 µmol, 8%) erhalten.

Für Amino-CoA-Substrate, die für die Beladung von Carrier Proteinen verwendet wurden, wurde die Synthese ohne DPCK durchgeführt, was zu der Bildung von Dephospho-Amino-CoA führt. Da der AMP-Rest bei der Übertragung durch Ppant-Transferasen abgespalten wird, ist die fehlende Phosphatgruppe nicht mehr von Bedeutung.

4.5.4 Synthese von Ser-NHCoA

Für die Kupplung von Serin an Amino-CoA wurden 5.53 mg (12.5 µmol, 2.5 äq.) Boc-Ser(OtBu)·DCHA, 3.91 mg (7.5 µmol, 1.5 äq.) PyBOP und 0.5 mL (5 µmol, 1.0 äq.) einer 10 mM Lösung von Amino-CoA in 0.5 mL DMF gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 1 mL Entschützungslösung (TFA/TIPS/H₂O 95:2.5:2.5) aufgenommen, 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und erneut gefriergetrocknet. Zur Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der Rückstand in 1 mL 5% Acetonitril in Wasser mit 0.1% TFA gelöst und filtriert. Der Gradient, Laufmittel, Flussrate und Säule wurden wie in 4.5.1 beschrieben angewendet. Die Produktfraktionen wurden massenspektrometrisch ermittelt, vereinigt und gefriergetrocknet. Es wurden 2.3 mg (2.75 µmol, 55%) Ser-NHCoA erhalten.

ESI-MS: $[M+H]^+_{\text{exp.}} = 838.2$; $[M+H]^+_{\text{theor.}} = 838.6$; $[M+2H]^{2+}_{\text{exp.}} = 419.6$; $[M+2H]^{2+}_{\text{theor.}} = 419.3$.

4.6 Biochemische Untersuchungen

4.6.1 Aktivierungsassays von 3-Hydroxyfettsäuren durch Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL) aus *B. subtilis*

Um die Aktivierung der Fettsäure für den Einbau in Surfactin zu untersuchen, wurden die Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL) LcfA, YhfL, YhfT und YngI aus *Bacillus subtilis* rekombinant produziert und *in vitro* charakterisiert. Dazu wurden MgCl_2 (1 mM), ATP (1 mM), CoA (10 mM), DMSO (1% (v/v)), 3-Hydroxymyristinsäure (100 oder 500 μM) und eine FACL (2 μM) in einem Reaktionsvolumen von 100 μL in Dialysepuffer (25 mM Hepes A, 50 mM NaCl, pH 7.0) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Assays wurden durch Zugabe von 30 μL Ameisensäure unterbrochen und nach Zentrifugation mit HPLC-MS analysiert. Die Trennung erfolgte auf einer 125/3 Nucleodur C8 100-3 ec Säule (Macherey & Nagel) bei 30 °C und einer Flussrate von 0.2 mL/min mit einem Gradienten von 5-95% Laufmittel B (Laufmittel A: 2 mM NEt_3 in $dd\text{H}_2\text{O}$; Laufmittel B: 2 mM NEt_3 in Acetonitril) in 30 min, nachdem 5 min bei 5% Laufmittel B gehalten wurde. Die Produkte wurden mittels UV-Detektion bei 215 nm und gekoppelter ESI-MS-Analyse im negativen *selected-ion*-Modus analysiert.

Zur Bestimmung der Spezifität der FACL wurden die Assays unter gleichen Bedingungen durchgeführt, in denen 3-Hydroxymyristinsäure durch verschiedene Fettsäuren substituiert wurde.

4.6.2 Assays zur Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion der Surfactinbiosynthese

4.6.2.1 Beladung von SrfAA-PCP1

Zur Beladung der PCP-Domänen wurde in allen Fällen die Promiskuität der Ppant-Transferase Sfp aus *Bacillus subtilis* genutzt. Sfp transferiert den Phosphopantetheinylrest von CoA und von CoA-Derivaten auf den hochkonservierten Serinrest von Carrier Proteinen. Für die Beladung von SrfAA-PCP1 wurden *apo*-PCP (20 μM), GluCoA (100 μM), MgCl_2 (10 mM) und Sfp (1 μM) in Dialysepuffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für Spezifitätsuntersuchungen wurde entweder SrfAA-PCP1 durch andere PCP-Domänen oder GluCoA durch andere Aminoacyl-CoA-Derivate substituiert.

4.6.2.2 Kondensationsassay mit SrfAA-C1

Zu der Reaktionslösung von 4.6.2.1 wurde SrfAA-C1 (40 μ M) und 3-Hydroxymyristinsäure-CoA (100 μ M) zugegeben. Für *in situ* Aktivierung wurde statt 3-Hydroxymyristinsäure-CoA die freie Fettsäure (100 μ M), DMSO (1% (v/v)), eine FACL (2 μ M), ATP (1 mM) und CoA (1 mM) zugegeben. Nach Inkubation für 20 min bei 37 °C wurde SrfTEII in einer Endkonzentration von 2 μ M zugegeben und für weitere 10 min inkubiert, um die Substrat-PCP-Thioester zu hydrolysieren. Durch Zugabe des fünffachen Volumens MeOH wurde die Reaktion unterbrochen und die Proteine durch Inkubation bei -20 °C für mindestens 3 h gefällt. Die Mischung wurde zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C) und der Überstand in einer Vakuumzentrifuge bei 30 °C getrocknet. Alternativ wurden die Substrate alkalisch mit KOH abgespalten (s. Abschnitt 4.6.3). Der Rückstand wurde in 25 μ L 5% Acetonitril in *ddH*₂O aufgenommen und mittels HPLC-MS wie in 4.6.1 beschrieben untersucht.

Für Spezifitätsuntersuchungen wurden Assays unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, in denen einzelne Komponenten gegen Substratanaloga substituiert wurden. Zur Analyse der Varianten von SrfAA-C1 wurden diese in der gleichen Konzentration wie der Wildtyp (40 μ M) eingesetzt.

4.6.3 Alkalische Spaltung von Substrat-PCP-Thioesterbindungen durch KOH

Um PCP-gebundene Substanzen unabhängig von anderen Assay-Bestandteilen zu untersuchen, kann der Thioester basisch hydrolysiert werden. Dazu wurde das fünffache Assayvolumen einer 10%igen (w/v) TCA-Lösung hinzugefügt und das Gemisch für mindestens 10 min auf Eis inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu präzipitieren. Nach Zentrifugation (45 min, 13000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit 250 μ L Diethylether/Ethanol-Gemisch (3:1, v/v) gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Das Pellet wurde noch einmal mit 250 μ L reinem Diethylether gewaschen, 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und 5 min bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 μ L 0.1 M KOH gelöst und 15 min bei 70 °C und 1200 rpm im Heizschüttler inkubiert, wodurch kovalente Thioesterbindungen hydrolysiert und die PCP-gebundenen Substrate freigesetzt werden. Die Proteine wurden durch Inkubation über Nacht mit 500 μ L MeOH bei -20 °C präzipitiert und durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde in einer Vakuumzentrifuge bei 30 °C getrocknet und der verbleibende Rückstand für die HPLC-MS-Analyse nach 4.6.1 in 25 μ L 5% Acetonitril in *ddH*₂O gelöst.

4.6.4 Präparative Beladung von Carrier Proteinen (CP)

Um lagerbare Mengen reiner Carrier Proteine zu erhalten, die mit dem gewünschten Substrat beladen sind, wurde eine präparative Beladung mit anschließender Gelfiltration durchgeführt. Das Carrier Protein wurde dabei in Konzentrationen von 200 μ M bis 1 mM in 2-4 mL Reaktionsvolumen eingesetzt und mit zweifachem Überschuss des gewünschten CoA-Substrats, $MgCl_2$ (10 mM) und Sfp (5 μ M) für 2 h bei 37 °C in Dialysepuffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) inkubiert. Für die Herstellung von 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP wurden zusätzlich FAD (250 μ M) und HxcO (5 μ M) zur Reaktionslösung gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert (5 min, 13000 rpm) und auf eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule (125 mL Säulenvolumen, GE Healthcare) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen Dialysepuffer bei einer Flussrate von 1 mL/min. Die 2 mL Fraktionen wurden mittels qualitativem Bradford und SDS-PAGE analysiert und Fraktionen, die reines Carrier Protein enthielten, wurden vereinigt und mit einem Amicon Ultrakonzentrator auf eine Konzentration von mindestens 100 μ M eingeeengt. Die Konzentration wurde mit dem BC-Assay (s. 4.2.6.3) bestimmt. Zur Kontrolle der Reinheit und erfolgreichen Beladung wurden die Carrier Proteine mittels HPLC-MS mit einer CC 250/3 Nucleosil C18 120-3 Säule (Macherey-Nagel) bei 45 °C und einer Flussrate von 0.8 mL/min analysiert. Dabei wurde ein Gradient von 40-57.3% Laufmittel B (Laufmittel A: 0.1% (v/v) TFA in ddH_2O ; Laufmittel B: 0.1% (v/v) TFA in Acetonitril) über 27 min angelegt, gefolgt von einer Erhöhung auf 95% Laufmittel B in 3 min, und einer anschließenden Äquilibration der Säule auf 40% Laufmittel B. Die Detektion der Analyten erfolgte durch eine UV-Einheit und durch ESI-MS im positiven Scan-Modus von 400-2000 m/z. Die Proteinmassenrekonstruktion erfolgte mit der Software LC/MSD ChemStation Version B.01.03[204] von Agilent Technologies.

4.6.5 Assays zur Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion der CDA-Biosynthese

4.6.5.1 Beladung der Carrier Proteine für die Lipoinitiation von CDA

Für Spezifitätsuntersuchungen von Cda-C1 wurden die Carrier Proteine im analytischen Maßstab beladen und ohne weitere Aufreinigung für die Übertragungsreaktion verwendet. Dafür wurde das Carrier Protein (200 μ M) mit dem entsprechenden CoA-Derivat (800 μ M), $MgCl_2$ (10 mM) und Sfp (5 μ M) in Dialysepuffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) 45 min bei 30 °C inkubiert. Für die

Herstellung von 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP wurde zusätzlich FAD (250 μ M) und HxcO (5 μ M) bei Verwendung von Hexanoyl-CoA oder FAD (250 μ M), NADH (250 μ M) und HcmO (10 μ M) bei Verwendung von 2-Hexenoyl-CoA zugegeben. Die Reaktionslösung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit direkt für die Kondensationsreaktion mit Cda-C1 verwendet (s. 4.6.5.2).

4.6.5.2 Kondensationsassay mit Cda-C1

Cda-C1 (5 μ M) wurden mit 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP (70 μ M) und Serinoyl-*S*-PCP (70 μ M) in Dialysepuffer in einem Gesamtvolumen von 80 μ L 45 min bei 30 °C inkubiert. Für Spezifitätsuntersuchungen wurde jeweils eine Komponente des Assays substituiert. Die beladenen Carrier Proteine stammten dabei entweder direkt aus den Beladungsassays (s. 4.6.5.1) oder aus einer Reinigung mittels Gelfiltration (s. 4.6.4). Die Reaktion wurde mit 10% (v/v) Ameisensäure (Endkonzentration) unterbrochen und nach Zentrifugation (3 min, 13000 rpm) einer HPLC-MS-Analyse nach 4.6.4 unterzogen. Allerdings wurde ein zweistufiger Gradient von 40-50% Laufmittel B in 18 min und 50-54% Laufmittel B in weiteren 18 min nach 4.6.4 angewendet.

4.6.6 Assays zur Untersuchung von BacA-Cy2

BacA-PCP1 (300 μ M) wurde mit LeuCoA (3 mM), $MgCl_2$ (10 mM) und Sfp (5 μ M) 45 min bei 30 °C in Dialysepuffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) inkubiert. BacA-APCP2 wurde nicht durch ein CoA-Derivat mit Sfp beladen, sondern durch Aminosäurenaktivierung und Übertragung durch A-Domänen-Katalyse. BacA-APCP2 (150 μ M) wurde dafür ebenfalls 45 min bei 30 °C mit $MgCl_2$ (10 mM), Sfp (5 μ M), CoA (800 μ M), DTT (1 mM), Cystein (1 mM) und ATP (2 mM) in Dialysepuffer inkubiert. Für Spezifitätsuntersuchungen wurden einzelne Komponenten der Assays substituiert. Die Ansätze wurden direkt für die Inkubation mit BacA-Cy2 weiterverwendet.

Anschließend wurde BacA-Cy2 (10 μ M) mit Aminoacyl-*S*-APCP2 (70 μ M) und Leu-*S*-PCP (70 μ M) 45 min bei 30 °C inkubiert. Um die PCP-gebundenen Substrate und Produkte zu identifizieren, wurde die Thioesterbindung entweder durch Zugabe von SrfTEII (4 μ M) für die letzten 10 min der Inkubationszeit hydrolysiert (s. 4.6.2.2) oder durch alkalische Hydrolyse mit KOH gespalten (s. 4.6.3). Das Hydrolysat wurde mittels HPLC-MS analysiert. Nach Injektion auf eine CC 250/3 Nucleosil C18 120-3 Säule (Macherey-Nagel) bei 30 °C wurde ein Gradient von 10-60% Laufmittel B (Laufmittel A: 0.1% (v/v) TFA in *ddH*₂O; Laufmittel B: 0.1% (v/v) TFA in

4 Methoden

Acetonitril) angewendet, gefolgt von einer Erhöhung auf 90% Laufmittel B in 5 min und anschließender Äquilibration der Säule auf 10% Laufmittel B. Die Analyten wurden mit UV-Detektion bei 214 nm und einer gekoppelten ESI-MS-Einheit im positiven *single-ion*-Modus identifiziert.

5 Ergebnisse

5.1 Lipoinitiation in der Surfactin-Biosynthese

Surfactin gehört zu den prominentesten und am besten untersuchten Vertretern der Klasse der Lipopeptide. Über die Aktivierung und den Einbau des Fettsäureanteils während der Biosynthese des Lipoheptapeptids war jedoch zu Beginn dieser Promotionsarbeit wenig bekannt. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der Aufklärung dieser beiden Schritte durch Charakterisierung verschiedener Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL) und deren Einfluss auf die Surfactin-Produktion durch Deletion der zugehörigen Gene in *Bacillus subtilis* und Charakterisierung der Initiations-C-Domäne der NRPS SrfAA. Dazu wurde nur das erste Modul (C-A-PCP) dieser trimodularen NRPS kloniert und exprimiert (SrfAA-M1), ebenso wie die erste C-Domäne (SrfAA-C1) und die erste PCP-Domäne (SrfAA-PCP1) dieses Moduls, um die katalysierte Übertragungsreaktion *in vitro* unabhängig von anderen Domänen untersuchen zu können.

Zur Festlegung der Domänengrenzen wurden die Domänen und die dazwischen liegenden Linker zunächst anhand der konservierten Kernmotive (s. Anhang 9.2) und mit Hilfe des Online-Tools *NRPS Predictor 2* identifiziert.²¹⁴ Eine Sekundärstrukturvorhersage der zu untersuchenden Domäne und der anschließenden Linkerregionen mittels PSI-pred (s. 3.3) wurde verwendet, um geeignete Domänengrenzen innerhalb der Linkerregionen festzulegen. Dabei wurde darauf geachtet, keine strukturell wichtigen Sekundärelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter zu verkürzen, sondern die Grenze in zufällig geordnete Strukturbereiche zu legen, um die korrekte Faltung der Domäne zu ermöglichen und Löslichkeitsprobleme durch hydrophobe Aggregation zu minimieren.

5.1.1 Heterologe Expression und Reinigung von *lcfA*, *yhfL*, *yhfT*, *yngI*, *srf-TEII*, *srfAA-M1*, *srfAA-C1* und *srfAA-PCP1*

Die Gene *lcfA*, *yhfL*, *yhfT*, *yngI*, *srf-TEII* und die Genfragmente *srfAA-M1*, *srfAA-C1* und *srfAA-PCP1* wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und die resultierenden Proteine über IMAC (s. 4.2.3) gereinigt, da alle Proteine mit einem His₆-Tag fusioniert wurden. YhfL und YngI wurden zusätzlich durch Produktion im Vektorsystem pBAD102 mit Thioredoxin fusioniert. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE analysiert (Abb. 5.1) und mit Peptidmassen-Fingerabdruck identifiziert (s. 4.3.2).

Die Proteine wurden durch Ultrazentrifugation auf die gewünschte Konzentration gebracht und mit den folgenden Ausbeuten pro Liter Zellkultur erhalten: 1.5 mg LcfA, 0.8 mg YhfL, 4.8 mg YhfT, 1.0 mg YngI, 2.9 mg Srf-TEII, 6.5 mg SrfAA-M1, 7.5 mg SrfAA-C1 und 3.6 mg SrfAA-PCP1.

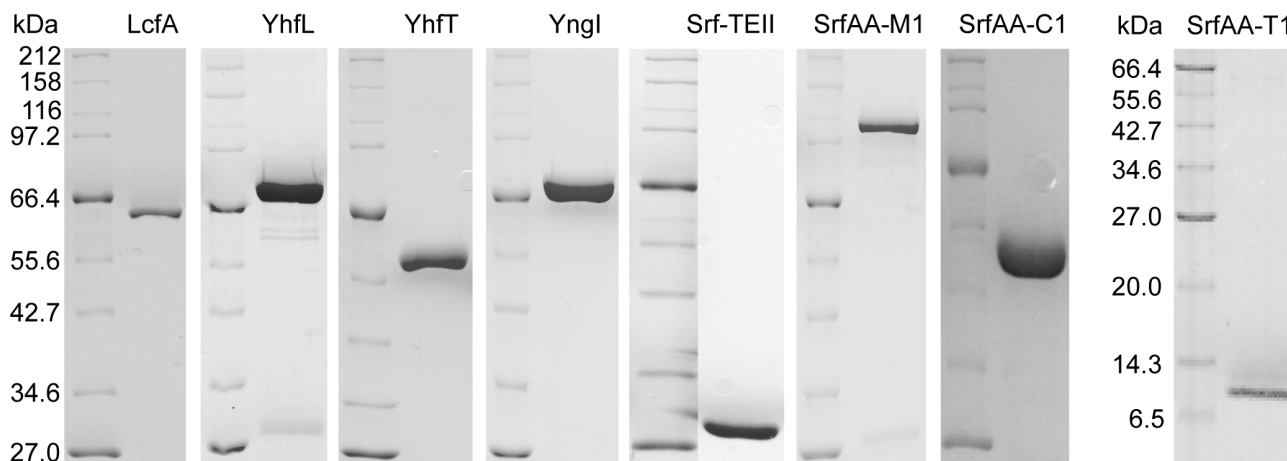


Abb. 5.1: SDS-PAGE-Analyse von LcfA (62.7 kDa), YhfL (73.5 kDa), YhfT (55.2 kDa), YngI (73.2 kDa), Srf-TEII (27.7 kDa), SrfAA-M1 (117.2 kDa), SrfAA-C1 (52.7 kDa), SrfAA-PCP1 (10.9 kDa). Als Größenstandard wurde der Protein Marker Broad Range (2-212 kDa, New England BioLabs) verwendet.

5.1.2 Fettsäureaktivierung durch die FACL LcfA, YhfL, YhfT und YngI

Zu Beginn der Promotionsarbeit war bereits bekannt, dass die Biosynthese von Surfactin durch Zugabe eines CoA-Derivats der Fettsäure gestartet werden kann.²¹⁵ Im biosynthetischen Gencluster von Surfactin sind jedoch keine Enzyme kodiert, die mit der Aktivierung einer Fettsäure in Verbindung gebracht werden könnten. Durch BLAST-Analysen vorhergehender Studien konnten vier putative Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen im Genom von *Bacillus subtilis* identifiziert werden.²¹⁶⁻²¹⁷ Diese Enzymklasse enthält neben einem ATP-Bindungsmotiv auch ein konserviertes FACL-Motiv und katalysiert die Übertragung eines Fettsäurerests unter Verbrauch von ATP auf Coenzym A.¹⁹⁹ Ein Alignment mit der eingehend untersuchten FACL FadD aus *E. coli* verdeutlicht die beiden konservierten Motive (Abb. 5.2).

Die Sequenzidentitäten zu FadD betragen für LcfA 38.2%, für YhfL 38.8%, für YhfT 21.7% und für YngI 26.2%. YhfT weist neben der niedrigsten Sequenzidentität zu FadD auch die niedrigste Ähnlichkeit im Bereich des FACL-Motivs zu FadD auf, während LcfA und YhfL die größte Übereinstimmung zeigen.

A

FadD	205	PE-DLAF	LQYTG	GGTTG	VAKG	AMLT	HRNML	AN	//	353	LLEGYGL	TECAP	LVSVN	PPYDI	--DYH	SGSI
LcfA	204	PEHDI	AVLQY	TGGTTG	APKG	VMLTH	QNIL	AN	//	351	LVEGYGL	SEASPV	THANFI	WG--	KNK	PGSI
YhfL	167	PD-DT	AVILY	TSGTTG	KPKG	AMLT	HQNL	YSN	//	311	ILEGYGL	SEASPV	TCFNP	FD	--GR	KPGSI
YhfT	189	PE-HP	FYMG	FTSG	STGK	PKAF	TRSH	RSMES	//	334	LYDFYGT	SELSFV	TFSS	PEDS	--KR	KPHSA
YngI	141	DKDN	VINM	QYTS	GTTG	FPKG	VMLTH	FNVIN	//	281	ITIA	YGQTE	ASPVIT	QTRANS	FIR	RVETT
					*	*	*	*								
					*	*	*	*								

B

FadD	410	KGPQV	MLGY	QRP	DAT-	DEI	IKNG	WLH	TGDI	AVM	DEEG	FLR	IVDR	KKDM	ILV	SGF	NVYP	N
LcfA	409	KGPQV	MKG	YWN	KPE	ET-	AAVL	RDG	WLF	TGDM	GYM	DEEG	FFYI	ADR	KKDI	III	AGG	NIYPR
YhfL	368	KGP	NVM	KGY	KMP	MET-	EHAL	KDG	WLY	TGDL	ARR	DE	DGYF	YIV	DR	KKDM	IIV	GGYNVYPR
YhfT	394	KSP	MR	FSG	YVN	-----	GST	PDE	MTV	DDM	GYV	DEEG	FLYI	SGRE	NGM	IVY	GG	LNIFPE
YngI	338	RGYH	VMK	GYK	DKD	DAT	RKA	INH	DG	WLF	TGDL	AVM	DE	DGYC	RI	TGRL	KDML	IRGGENIYPR

Abb. 5.2: ClustalW-Alignment von FadD (*E. coli*), LcfA, YhfL, YhfT, YngI (*B. subtilis*). Die Striche über der Sequenz kennzeichnen die innerhalb dieser Enzymklasse konservierten Motive, konservierte Reste sind mit Sternchen markiert. Der jeweils am höchsten konservierte Rest innerhalb der Sequenzen ist rot hinterlegt. A: Alignment des ATP-bindenden Bereichs. B: Alignment des Bereichs um das 25 Aminosäure enthaltende FACL-Motiv.

Um die Rolle dieser vier Enzyme im Zusammenhang mit der Surfactinbiosynthese zu untersuchen, wurden diese zum einen für *in vitro* Studien heterolog exprimiert und gereinigt und zum anderen wurden Deletionsmutanten der entsprechenden Gene in *Bacillus subtilis* generiert und diese auf ihre Surfactin-Produktion untersucht. Für die *in vitro* Aktivierung von 3-Hydroxymyristinsäure wurden die gereinigten FACL nach 4.6.1 mit der Fettsäure und Coenzym A inkubiert. In der HPLC-MS-Analyse wurden im negativen *single-ion*-Modus neben der CoA-aktivierten Fettsäure auch das AMP-Adenylat berücksichtigt, welches als Intermediat in der katalysierten Reaktion auftritt (Abb. 5.3A). Ein Ausschnitt der aufgenommenen Chromatogramme ist in Abb. 5.3B gezeigt. Bei der Reaktion mit LcfA und YhfL konnten beide Reaktionsprodukte, 3-Hydroxymyristoyl-adenylat und 3-Hydroxymyristoyl-CoA, durch deutliche Signale bei 33.0 min und 29.2 min detektiert werden. Im Falle von YhfT konnte nur das Zwischenprodukt der Reaktion, nämlich das Acyladenylat, beobachtet werden. YngI wies unter den verwendeten Bedingungen keine Aktivität auf. Die Enzyme LcfA und YhfL wurden weitergehend auf ihre Spezifität untersucht, wobei Fettsäuren in der Länge von 8-14 Kohlenstoffatomen mit oder ohne 3-Hydroxygruppe getestet wurden (Tabelle 5.1). Beide Enzyme wiesen eine breite Substratspezifität auf und aktivieren auch Fettsäuren, die nicht im Lipopeptid Surfactin zu finden sind. Die verzweigte Fettsäure 13-Methyl-tetradekansäure wurde dagegen weder von YhfL noch von LcfA aktiviert.

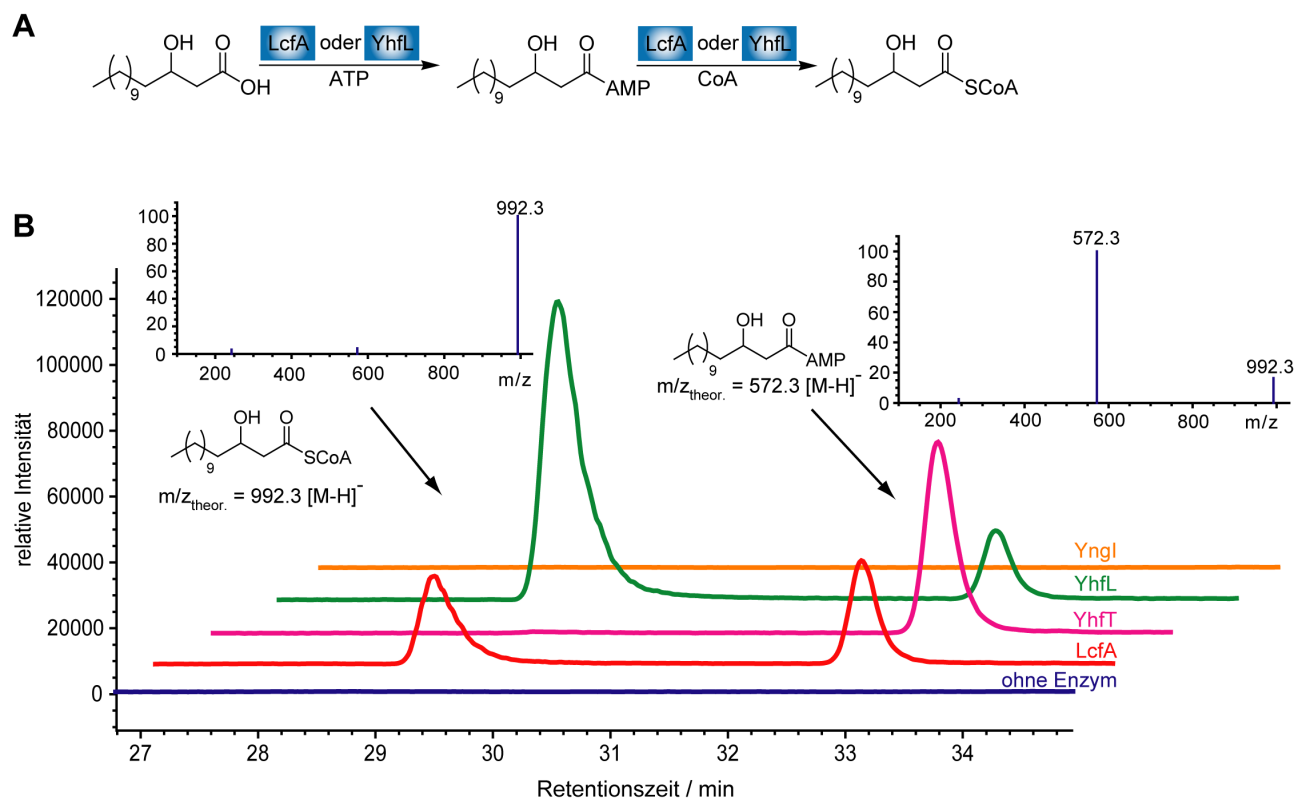


Abb. 5.3: Aktivierung von 3-Hydroxymyristinsäure. A: Reaktionsgleichung der Aktivierung.

B: HPLC-Chromatogramme und die zugehörigen Massenspektren des ESI-MS Signals (negativer *single-ion*-Modus) der Aktivierung durch LcfA (rot), YhfT (magenta), YhfL (grün) und YngI (orange) und einer Kontrollreaktion ohne Enzym (blau).

Tab. 5.1: Substratspezifität von LcfA und YhfL. n.d. = nicht detektiert.

Fettsäure-CoA	$[M-H]^-_{\text{theor.}}$	LcfA	YhfL
		$[M-H]^-_{\text{exp.}}$	$[M-H]^-_{\text{exp.}}$
3-Hydroxymyristinoyl-CoA	992.309	992.3	992.3
3-Hydroxyoktanoyl-CoA	908.215	908.4	908.4
3-Hydroxydekanoyl-CoA	936.246	936.4	936.4
Dodekanoyl-CoA	948.282	948.5	948.5
Tetradekanoyl-CoA	976.314	(976.3)	976.4
13-Methyl-tetradekanoyl-CoA	990.329	n.d.	n.d.

5.1.3 Surfactin-Produktion in FACL-Deletionsmutanten von *B. subtilis*

Um die Beteiligung der identifizierten und *in vitro* charakterisierten FACL an der Surfactin-Biosynthese zu überprüfen, wurde der Einfluss der Deletion dieser Gene auf die Surfactin-

Produktion untersucht. Dazu wurden *knock-out*-Mutanten des Stammes *Bacillus subtilis* OKB105 erstellt, in denen jeweils ein, zwei, drei oder alle vier Gene der untersuchten FACL deletiert wurden. Die Mutanten wurden zunächst in dem Surfactin-defizienten Stamm *B. subtilis* MR168 produziert, dessen Transformationseffizienz mit DNA-Fragmenten deutlich höher ist. Um bei der Transformation des Genoms dieses Stamms mit *B. subtilis* OKB105 sicher zu stellen, dass die homologe Rekombination nicht auch das Gen *sfp* betraf, das bei dem Stamm MR168 infunktionell ist, wurde durch Ausstreichen auf CAS-Agarplatten die Sfp-abhängige Produktion von Siderophoren überprüft. CAS bildet mit Eisen einen farbigen Komplex. Wird das Eisen z.B. durch Siderophore mit hoher Affinität gebunden, ist dies durch den Verlust der Fe-CAS-Komplexfarbe an der jeweiligen Stelle zu erkennen. Abb. 5.4 zeigt eine solche CAS-Agarplatte mit ausgewählten Mutantenstämmen von *B. subtilis* OKB105, bei denen ein deutlicher Hof um die Kolonien sichtbar ist, der die Präsenz von eisenchelatierenden Verbindungen anzeigt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Gen *sfp* in diesen Stämmen intakt ist und die Produktion von Sfp-abhängigen Naturstoffen wie auch Surfactin somit prinzipiell möglich ist.

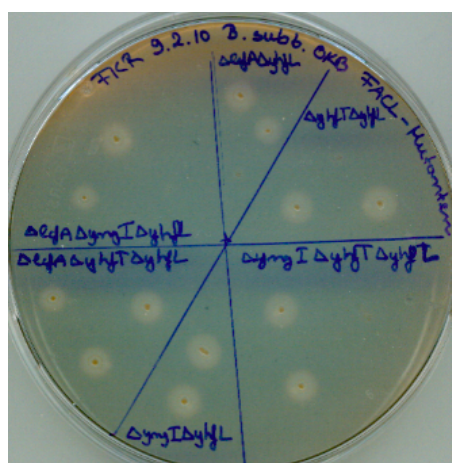


Abb. 5.4: CAS-Agarplatte der Deletionsmutanten *B. subtilis* OKB105 $\Delta lcfA\Delta yhfL$ (oben), $\Delta yhfT\Delta yhfL$ (oben rechts), $\Delta lcfA\Delta yngI\Delta yhfL$ (oben links), $\Delta lcfA\Delta yhfT\Delta yhfL$ (unten links), $\Delta yngI\Delta yhfL$ (unten), $\Delta yngI\Delta yhfT\Delta yhfL$ (unten rechts).

Die generierten Deletionsmutanten wurden in SpIII-Medium fermentiert und bis zu einer OD_{600} von ~ 1.5 angezogen, da Surfactin in der stationären Phase ein Produktionsmaximum erreicht. Nach anschließender Extraktion mit *n*-Butanol (s. 4.4) wurde das produzierte Surfactin mittels HPLC-MS identifiziert und über Integration des UV-Signals quantifiziert. Abb. 5.5 zeigt exemplarisch die HPLC-Chromatogramme für den Wildtyp und die Vierfachmutante $\Delta lcfA\Delta yhfT\Delta yngI\Delta yhfL$. Um die produzierten Surfactin-Mengen der verschiedenen Mutanten vergleichen zu können, wurde der aus den UV-Signalen erhaltene Wert der Fläche durch die OD_{600} der entsprechenden Kultur zum

Zeitpunkt der Ernte dividiert und damit auf eine OD₆₀₀ von 1 bezogen. In Abb. 5.6 sind die produzierten Surfactinmengen aller Mutanten als prozentualer Anteil von der Produktion des Wildtyps angegeben.

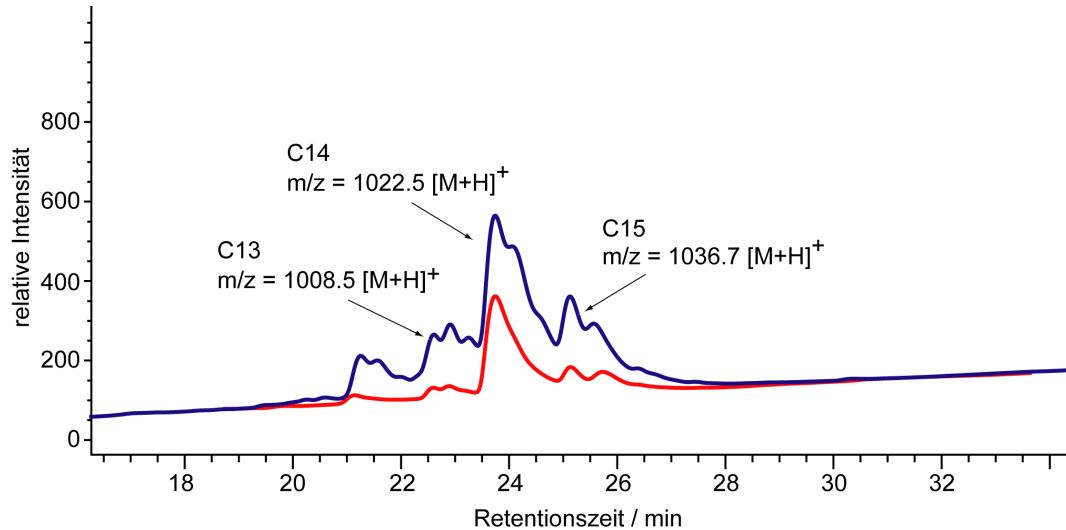


Abb. 5.5: HPLC-Chromatogramm der Surfactin-Extraktion des Wildtyps (blau) und der Vierfachmutante $\Delta lcfA\Delta yhfT\Delta yngI\Delta yhfL$ (rot). Das MS-Signal wurde im positiven Scan-Modus von 450-1200 m/z aufgenommen. Angegeben sind die gefundenen Massen der Signale und die zugehörige Länge der Fettsäure der jeweiligen Surfactin-Variante.

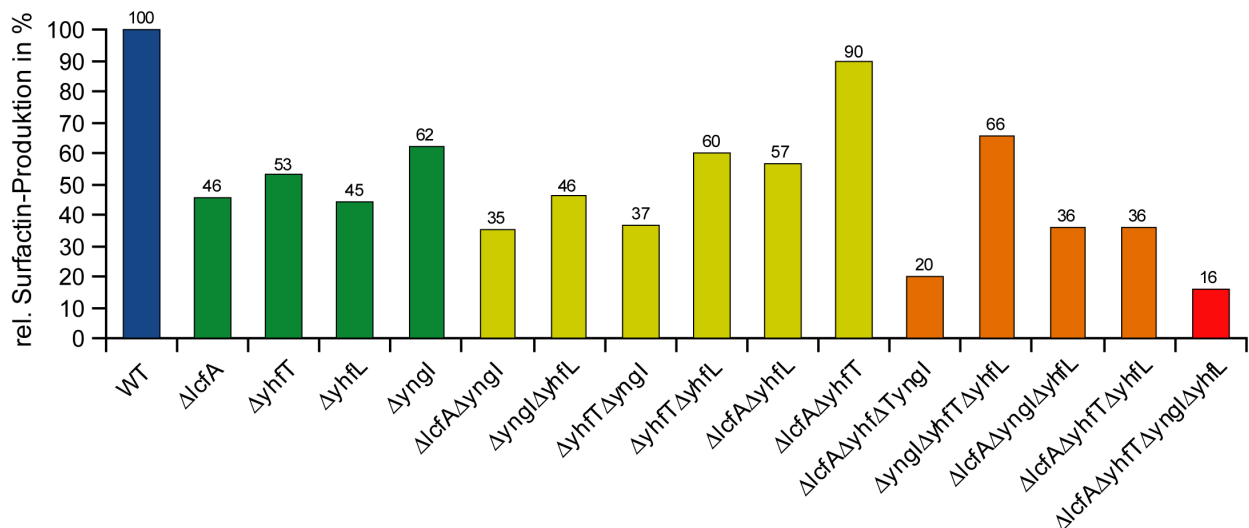


Abb. 5.6: Surfactin-Produktion der Deletionsmutanten. Die Produktionsmenge des Wildtyps (blau) wurde auf 100% gesetzt. Zur besseren Übersicht sind Einfachmutanten in grün, Doppelmutanten in gelb, Tripelmutanten in orange und die Vierfachmutante in rot dargestellt.

Sowohl in dem gezeigten Chromatogramm als auch in der Gesamtübersicht der Deletionsmutanten wird ersichtlich, dass die untersuchten FACL die produzierte Surfactin-Menge beeinflussen. Während die Einfachmutanten ähnliche Produktionen von 45-62% des Wildtyp-Levels zeigen, unterscheiden sich die Produktionsmengen der Doppelmutanten deutlich. Die Mutante $\Delta lcfA\Delta yngI$ zeigt eine Reduktion auf 35% des Wildtyp-Levels, während die Mutante $\Delta lcfA\Delta yhfT$ noch knapp 90% des Wildtyp-Levels erreicht. Für die Tripel-Mutanten ist eine Reduktion der Surfactin-Produktion um bis zu 80% zu beobachten. Die Vierfach-Mutante zeigt zwar die niedrigste Produktionsmenge mit 16% des Wildtyp-Levels, die Surfactin-Produktion ist jedoch nicht vollständig aufgehoben.

5.1.4 Transfer der aktivierten Fettsäure durch Katalyse von SrfAA-C1

5.1.4.1 Untersuchungen der Lipoinitiationreaktion mit dem Modul SrfAA-M1

In der dieser Arbeit vorangehenden Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass 3-Hydroxymyristoyl-CoA in Anwesenheit des mit Glutaminsäure beladenen Moduls SrfAA-M1 auf die α -Aminogruppe des PCP-gebundenen Glutamats übertragen wird.²¹⁶ Diese Erkenntnisse wurden während der Promotion noch einmal reproduziert und verfeinert. Dazu wurde das gereinigte Modul zunächst mit CoA, Sfp, Glutaminsäure und ATP (s. 4.6.2.1) inkubiert, wodurch Glutamat nach Aktivierung durch die A-Domäne an die PCP-Domäne des Moduls gebunden wurde. Dann wurde das Modul Glu-S-SrfAA-M1 mit chemisch synthetisiertem 3-Hydroxymyristoyl-CoA oder der freien Fettsäure und LcfA oder YhfL inkubiert (s. 4.6.2.2, Abb. 5.7A). Der Nachweis der Produkte erfolgte nach alkalischer (s. 4.6.3) oder enzymatischer Hydrolyse des Substrat-S-PCP-Thioesters per HPLC-MS-Analyse (Abb. 5.7B). In allen Reaktionen findet man ein Signal bei 20 min, dessen Masse 3-Hydroxymyristinsäure entspricht, welche durch unvollständige Entfernung bei dem Waschvorgang des Proteinpellets in die Probe gelangen kann. Allerdings ist in Anwesenheit der CoA-aktivierten Fettsäure ein deutliches Signal bei 12.5 min zu erkennen, das in der Kontrollreaktion ohne aktivierte Fettsäure nicht vorhanden ist und dessen zugehörige Masse dem erwarteten Kondensationsprodukts 3-Hydroxymyristoyl-Glutamat ($m/z = 372.3$) entspricht. Auch in der Reaktion, in der die Aktivierung der Fettsäure *in situ* durch Zugabe von LcfA erzielt wurde, ist ein Signal für die entsprechende Masse bei 12.5 min zu beobachten. Dieses Reaktionsprodukt konnte analog auch mit YhfL beobachtet werden.

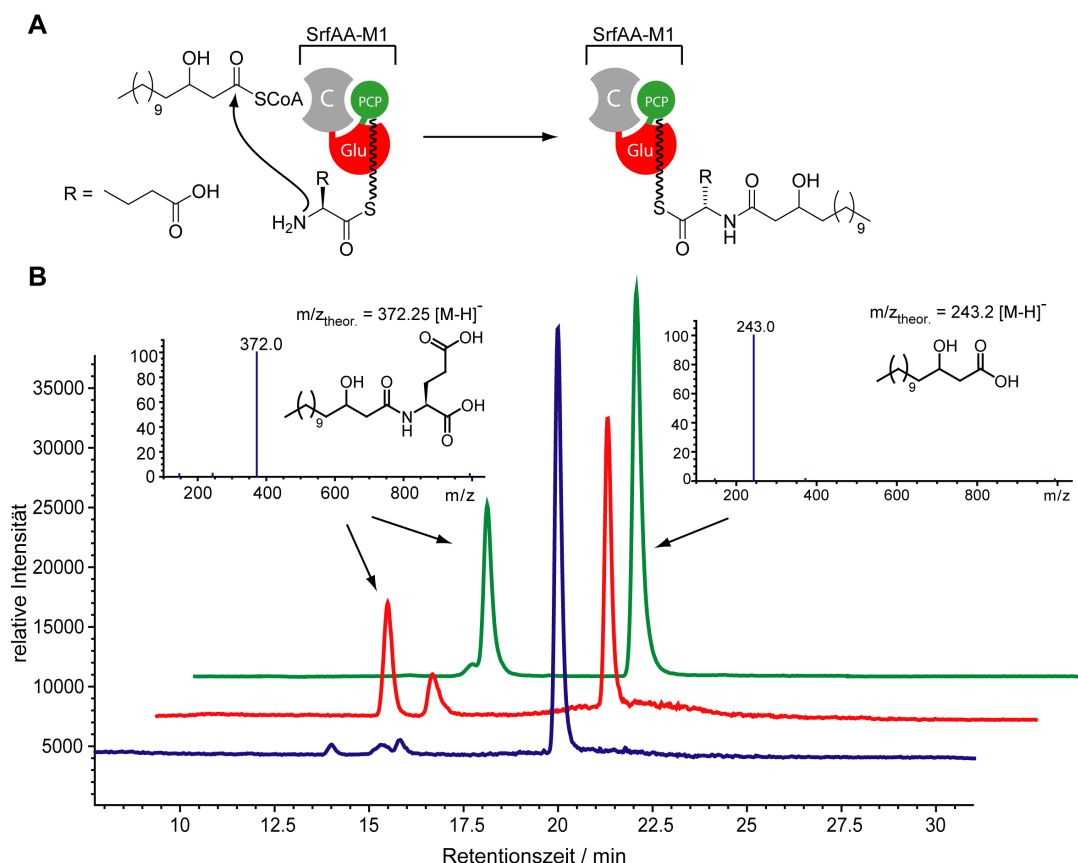


Abb. 5.7: Fettsäure-Transfer auf Glu-S-SrfAA-M1. A: Reaktionsschema der katalysierten Übertragung. B: HPLC-Chromatogramm nach Hydrolyse mit Srf-TEII ohne aktivierte Fettsäure (blau), mit *in situ* Aktivierung durch LcfA (rot) und mit chemisch synthetisiertem 3-Hydroxymyristoyl-CoA (grün) und die dazugehörigen Massenspektren, die im negativen *single-ion*-Modus aufgenommen wurden.

5.1.4.2 Untersuchungen der Lipoinitiationsreaktion mit der Initiations-C-Domäne SrfAA-C1

Nichtribosomal synthetisierte Lipopeptide weisen in der ersten NRPS eine N-terminale Initiations-C-Domäne auf, von der zu Beginn der Promotionsarbeit vermutet wurde, dass diese die *N*-Acylierung der ersten Aminosäure von Surfactin katalysiert. Um diese Annahme für die Biosynthese von Surfactin zu überprüfen, wurde die Initiations-C-Domäne (SrfAA-C1) als Fragment der Synthetase rekombinant produziert. Die PCP-Domäne SrfAA-PCP1 wurde ebenfalls als singuläres Protein rekombinant hergestellt. Diese wurde *in vitro* mit nach 4.5.1 synthetisiertem GluCoA durch Inkubation mit Sfp beladen (s. 4.6.2.1), um das Substrat auf der Akzeptorseite der C-Domäne bereitzustellen. Zu dieser Reaktion wurden anschließend SrfAA-C1 und 3-Hydroxymyristoyl-CoA gegeben und inkubiert (s. 4.6.2.2, Reaktionsschema s. Abb. 5.8A). Die HPLC-MS-Analyse der Reaktion nach Thioesterhydrolyse durch die externe Thioesterase SrfTEII

zeigt analog zu der Reaktion mit dem Modul SrfAA-M1 ein eindeutiges Signal mit der zugehörigen Masse des Kondensationsproduktes (Abb. 5.8B). Eine Kontrollreaktion ohne Zugabe von SrfAA-C1 enthält kein Kondensationsprodukt, wodurch die Katalyse des Transfers der Fettsäure durch die Initiations-C-Domäne SrfAA-C1 bestätigt wird.

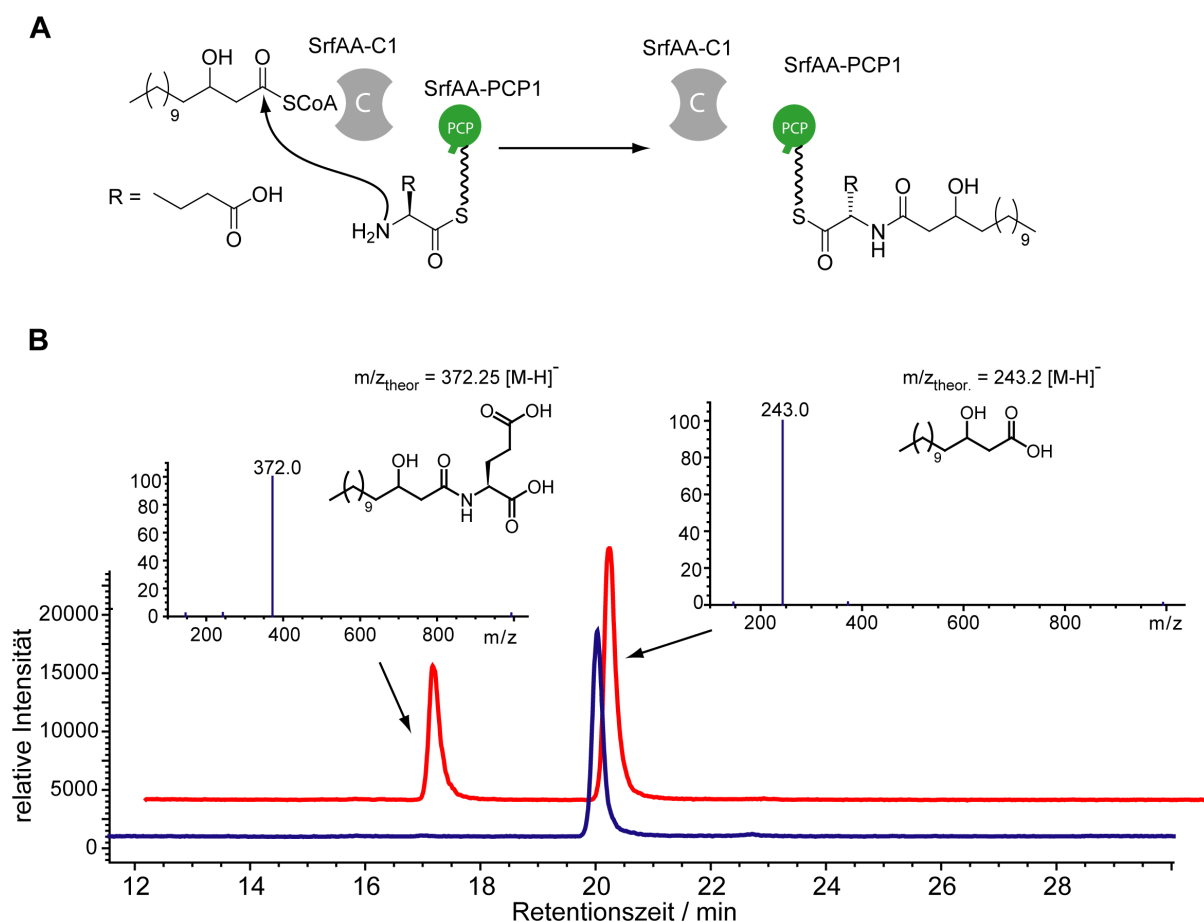


Abb. 5.8: Fettsäure-Transfer durch Katalyse von SrfAA-C1. A: Reaktionsschema. B: HPLC-MS-Analyse der Reaktion nach Hydrolyse mit Srf-TEII ohne SrfAA-C1 (blau) und in Anwesenheit von SrfAA-C1 (rot). Die gezeigten ESI-MS-Signale wurden im negativen *single-ion*-Modus aufgenommen.

Das Ausschneiden der C-Domäne SrfAA-C1 aus der Synthetase SrfAA ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der Substratspezifität. Es wurde nicht nur das Substrat auf der Donorseite durch unterschiedliche Fettsäuren ersetzt, sondern auch die Substrate auf der Akzeptorseite, also die PCP-gebundene Aminosäure und die PCP-Domäne selbst, wurden gegen andere Aminosäuren bzw. PCP-Domänen substituiert (Tabelle 5.2). 3-Hydroxymyristinsäure wurde in der Transferreaktion mit SrfAA-C1 durch verschiedenste Fettsäuren der Länge von 4-16 Kohlenstoffatomen mit und ohne 3-Hydroxygruppe substituiert. Der Großteil dieser Fettsäuren ist nicht als CoA-Derivat erhältlich,

weswegen die Aktivierung *in situ* durch Zugabe von LcfA, CoA und ATP durchgeführt wurde, die in Abschnitt 5.1.2 für diese Fettsäuren gezeigt wurde. Die *N*-Acylierung von Glu-S-PCP wurde jedoch mit keiner dieser Fettsäuren beobachtet, was für eine ausgeprägte Spezifität von SrfAA-C1 auf der Donorseite spricht.

Tab. 5.2: Substratspezifität von SrfAA-C1. Wurde das Acylierungsprodukt detektiert, ist dies mit „+“ angedeutet, „-“ steht für ein nicht beobachtetes Produkt. Freie Fettsäuren wurden *in situ* und enzymatisch durch LcfA aktiviert.

Donorseite		Akzeptorseite			
Fettsäure	Reaktion	Aminosäure	Reaktion	PCP-Domäne	Reaktion
3-Hydroxymyristinsäure	+	Glutaminsäure	+	SrfAA-PCP1	+
Oktansäure	-	Asparagin	(+)	CDA-PCP9	+
3-Hydroxyoktansäure	-	Phenylalanin	-	TycC-PCP5	+
Dekansäure	-	Lysin	-	TycC-PCP6	+
3-Hydroxydekansäure	-	Threonin	-	Cgc19	+
Myristinsäure	-				
Hexadekanoyl-CoA	-				
Dekanoyl-CoA	-				
3-Hydroxybutyryl-CoA	-				

Auf der Akzeptorseite wurde das PCP-gebundene Glutamat durch verschiedene Aminosäuren ersetzt. Jedoch konnte eine Acylierung mit 3-Hydroxymyristinsäure nur in geringen Mengen für Asn-S-PCP festgestellt werden. Strukturell entferntere Aminosäuren wie Phenylalanin, Lysin und Threonin wurden nicht acyliert. Interessanterweise konnte die PCP-Domäne jedoch gegen verschiedene andere Glu-S-PCP-Domänen substituiert werden, ohne die Übertragung des Fettsäurerestes zu unterbinden. Dabei wurden sowohl PCP-Domänen aus verwandten Organismen verwendet (TycC-PCP5 und TycC-PCP6 aus der Tyrocidin-Synthetase TycC aus *Bacillus brevis*⁶⁸) als auch aus anderen Gattungen (CDA-PCP9 aus der CDA-Synthetase CdaPS2 aus *Streptomyces coelicolor* A3(2)¹⁷⁶ und Cgc19 aus *Streptomyces ambofaciens*²¹⁸). Auch die singuläre PCP-Domäne Cgc19, die mit der Biosynthese von Congocidin in Verbindung gebracht wird, dient nach der Beladung mit Glutamat als Substrat für die Acylierung.

5.1.5 Untersuchung der SrfAA-C1 Varianten

Sequenzanalysen von C-Domänen aus NRPS zeigen ein hochkonserviertes Motiv (HHxxxDG), welches vermutlich an der Katalyse beteiligt ist.⁶⁵ Ortsgerichtete Mutagenese dieses Motivs in den Elongations-C-Domänen TycB-C1 aus der Tyrocidin-Synthetase TycB aus *B. brevis* und SrfAB-C1 aus der Surfactin-Synthetase SrfAB aus *B. subtilis* bestätigten diese Annahme und zeigten vor allem die Notwendigkeit des zweiten Histidins für die Katalyse.^{58,215} Initiations-C-Domänen weisen insgesamt niedrigere Sequenzidentitäten zu Elongations-C-Domänen auf, aber das katalytische Motiv HHxxxDG ist auch in diesen C-Domänen konserviert.⁶⁴ Substitutionen der Histidine 139 und 140 im Katalyse-Motiv in SrfAA-C1 sollten die Beteiligung dieser Reste am Fettsäuretransfer klären. Dazu wurden die Varianten H139A, H139AH140A und H140A von SrfAA-C1 durch ortsgerichtete Mutagenese (s. 4.1.5) hergestellt. Die gereinigten Proteine wurden analog zum Wildtyp hinsichtlich der Fettsäure-Übertragung (s. 4.6.2.2, Abb. 5.9A) untersucht. Nach Hydrolyse der Substrat-S-PCP-Thioester wurden die Ansätze mittels HPLC-MS analysiert (Abb. 5.9B). Als Kontrollreaktion diente ein Ansatz mit dem Wildtyp SrfAA-C1.

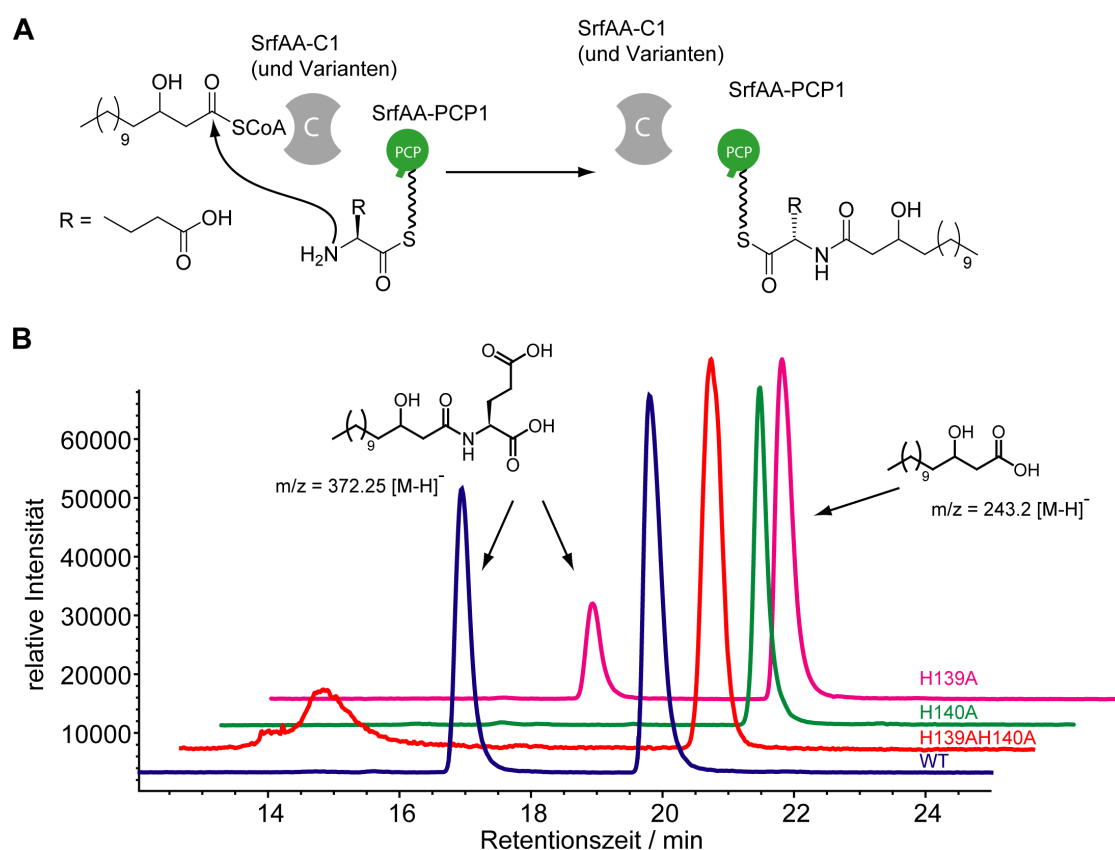


Abb. 5.9: Fettsäure-Transfer durch die Varianten H139A, H139AH140A und H140A. A: Reaktionsschema. B: HPLC-Chromatogramme der Reaktionen mit SrfAA-C1 (blau), H139AH140A (rot), H140A (grün) und H139A (magenta).

Bei der Variante H139A ist zu erkennen, dass das Acylierungsprodukt eindeutig gebildet wird, wenn auch in geringeren Mengen verglichen mit dem Wildtyp. In den Reaktionen mit den Varianten H139AH140A und H140A ist die Bildung des Acylierungsprodukts nicht zu beobachten, was deutlich auf die Beteiligung des Histidins 140 an der Katalyse hinweist.

Stachelhaus *et al.* postulierten eine Säure-Base-Katalyse für die Amidbindungsbildung unter Beteiligung des zweiten Histidins des katalytischen Motivs.⁵⁸ Weitere Mutagenese-Studien konzentrierten sich daher auf die Wiederherstellung der Aktivität bei Substitution des zweiten Histidins (H140), indem Histidin nicht durch eine unpolare Aminosäure wie Alanin substituiert wurde, sondern durch die polaren Aminosäuren Aspartat und Lysin, die prinzipiell auch in Säure-Base-Katalyse-Mechanismen beteiligt sein könnten. Für beide Varianten H140D und H140K konnte jedoch keine Produktbildung beobachtet werden (Abb. 5.10).

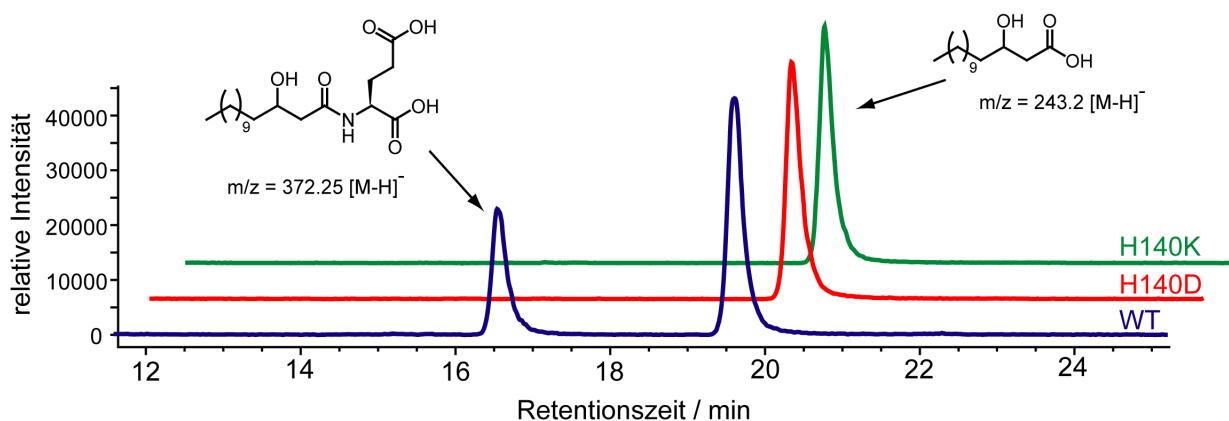


Abb. 5.10: HPLC-MS-Analyse der Fettsäure-Übertragung der SrfAA-C1 Varianten H140D (rot) und H140K (grün). Als Kontrolle diente ein Ansatz mit dem Wildtyp von SrfAA-C1 (blau).

5.2 Lipoinitiation in der CDA-Biosynthese

Streptomyces coelicolor A3(2) produziert einen Satz von Peptidantibiotika, die Calcium-abhängigen Antibiotika CDA, welche zu der Klasse der sauren Lipodepsipeptiden gehören, zu denen auch das zugelassene Medikament Daptomycin (Cubicin®) zählt. Im biosynthetischen Gencluster (s. 1.2.2) von CDA in *S. coelicolor* A3(2) sind einige Gene vorhanden, die mit der Fettsäure-Synthese und Aktivierung in Verbindung gebracht wurden.^{136,139,174} Nach der Synthese von Hexanoyl-S-ACP vermutlich durch die im Gencluster kodierten Proteine FabF3 und FabH4 und durch Enzyme aus dem Primärmetabolismus findet die Epoxidierung zu 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP durch HxcO oder HcmO statt, was von Kopp *et al.* gezeigt werden konnte.¹³⁹ Es wurde zu Beginn dieser

Promotionsarbeit vermutet, dass die ACP-gebundene Fettsäure als Substrat zur Acylierung der N-terminalen Aminosäure Serin dient, was die Kodierung eines ACPs im Gencluster der CDA-Biosynthese erklären würde. Diese Übertragung findet vermutlich unter Katalyse der Initiations-C-Domäne der NRPS CdaPS1 statt. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Studien dieser Übertragungsreaktion dargestellt. Für die *in vitro* Studien wurde die Initiations-C-Domäne der NRPS CdaPS1 als alleinstehendes Protein (Cda-C1) heterolog produziert und gereinigt. Als PCP-Domäne wurde entweder SrfAA-PCP1 oder DptA-PCP1 aus der Daptomycin-Synthetase von *Streptomyces roseosporus* verwendet, da die PCP-Domäne CdaPS1-PCP1 aufgrund eines extrem niedrigen Expressionslevels in *E. coli* nicht zugänglich war. Die Domänengrenzen der klonierten Domänen wurden unter Erhalt von prognostizierten Sekundärstrukturelementen wie in 5.1 beschrieben gewählt.

Die Strategie zur Untersuchung der Übertragungsreaktion ist in Abb. 5.11 schematisch dargestellt: Nach Beladung der Carrier-Proteine mit den entsprechenden Substraten (Schritt 1 und 2) werden diese mit rekombinantem Cda-C1 inkubiert (Schritt 3) und die Reaktion anschließend mit HPLC-MS analysiert (Schritt 4). Die programmunterstützte Auswertung der erhaltenen Massenspektren ermöglicht durch Dekonvolution der m/z -Serien die Rekonstruktion der Gesamtmassen des Analyts, welche dann mit den Massen der erwarteten Substrat-S-CP verglichen werden können.

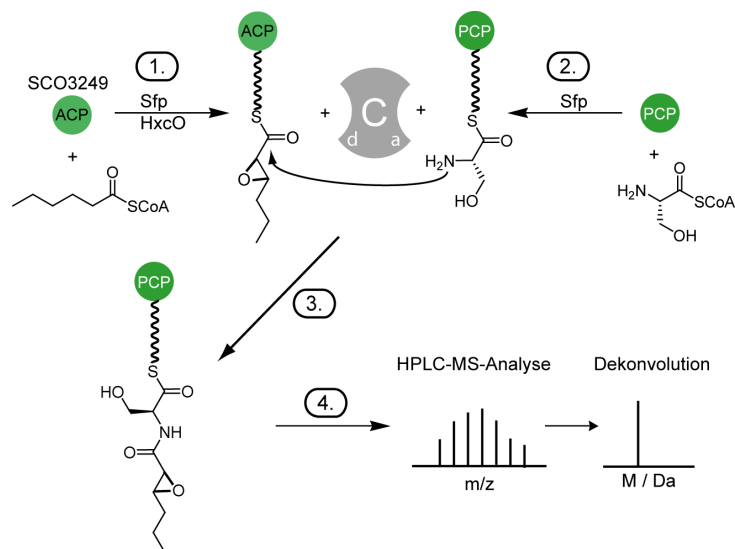


Abb. 5.11: Strategie zur Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion in der CDA-Biosynthese. Durch die Beladung der Carrier-Proteine mit den Substraten 2,3-Epoxyhexansäure und Serin wurden die putativen Substrate für Cda-C1 bereitgestellt (1., 2.). Die Analyse der Übertragungsreaktion durch Katalyse von Cda-C1 (3.) erfolgte mittels HPLC-MS (4.). Die putativen Substratbindungsstellen der dissektierten Initiations-C-Domäne Cda-C1 sind mit d (Donorseite) und a (Akzeptorseite) angedeutet.

5.2.1 Heterologe Expression und Reinigung von *cda-ACP*, *cda-C1*, *dptA-PCP1*, *hxcO* und *hcmO*

Die heterologe Expression der Gene *cda-ACP*, *hxcO*, *hcmO* und der Genfragmente *cda-C1* und *dptA-PCP1* erfolgte in pET28a(+)- oder pCB28a(+)-Vektoren in *E. coli* BL21(DE3) (s. 4.2.1). Die anschließende Reinigung wurde über IMAC und Entsalzung nach 4.2.3 und 4.2.5 erreicht. Die Identität der Proteine konnte mittels SDS-PAGE (Abb. 5.12) und Peptidmassen-Fingerabdruck (s. 4.3.2) bestätigt werden. Die Proteinlösungen wurden mit Ultrakonzentratoren eingeeengt und die Konzentration bestimmt (s. 4.2.6). Die Proteine wurden in folgenden Ausbeuten pro Liter Bakterienkultur erhalten: 4.7 mg Cda-ACP, 2.6 mg Cda-C1, 4.0 mg DptA-PCP1, 5.4 mg HxcO und 0.5 mg HcmO.

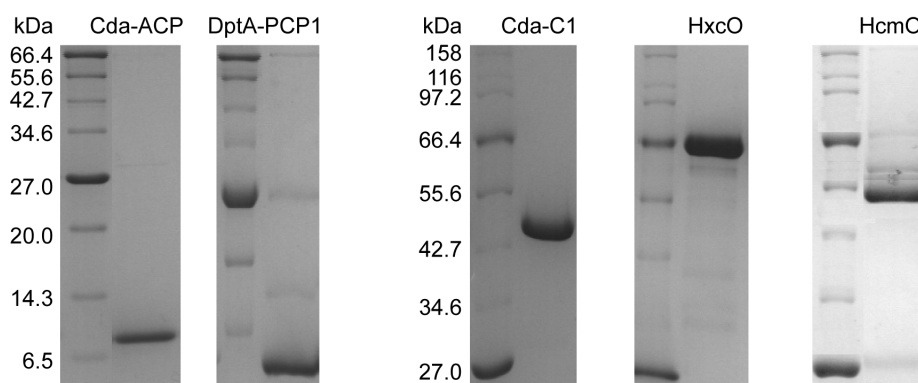


Abb. 5.12: SDS-PAGE-Analyse von Cda-ACP (11.5 kDa), DptA-PCP1 (12.4 kDa), Cda-C1 (48.7 kDa), HxcO (66.8 kDa) und HcmO (47.0 kDa). Als Größenstandard wurde der Protein Marker Broad Range (2-212 kDa, New England BioLabs) verwendet.

5.2.2 Darstellung von 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP und Ser-S-PCP

Es wurde vermutet, dass die Substrate für die *N*-Acylierung von Serin als Carrier-Protein(CP)-gebundene Intermediate vorliegen müssen, um die Lipoinitiation der CDA-Biosynthese zu ermöglichen. Deshalb wurden die entsprechenden Carrier-Proteine nach 4.6.4 mit dem jeweiligen CoA-Thioester und der 4'-Ppant-Transferase Sfp inkubiert und anschließend über eine Größenausschlusschromatographie aus der Reaktionsmischung isoliert. Da der Fettsäureanteil in dem Naturstoff CDA epoxidiert vorliegt, wurde der Beladungsreaktion für die Darstellung von 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP die FAD-abhängige Hexanoyl-ACP Oxidase HxcO und FAD zugegeben, um die Epoxygruppe wie von Kopp *et al.* beschrieben in das Substrat einzuführen.¹³⁹ Die Reinheit 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP wurde nach der Gelfiltration per SDS-PAGE (Abb. 5.13)

sicher gestellt. In dem Gel der Elutionsfraktionen der Gelfiltration ist für 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP zu erkennen, dass in den Fraktionen 19-22 eine Bande auftritt, deren Molekulargewicht dem von HxcO (66.8 kDa) entspricht. In den Fraktionen 21-24 ist eine Bande bei etwa 27 kDa zu erkennen, was dem Molekulargewicht von Sfp (27.2 kDa) entspricht. Vereinigt wurden die Fraktionen 24-27, in denen nur eine Bande mit einer apparenten Masse von 10 kDa zu erkennen ist, welche mit 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP (11.9 kDa) übereinstimmt.

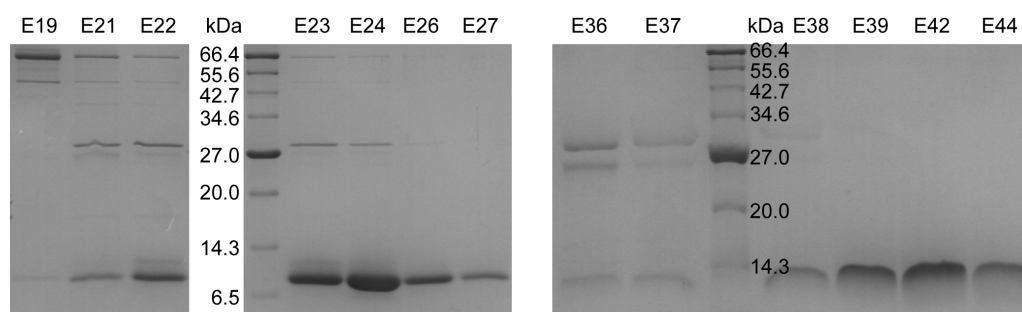


Abb. 5.13: SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen (E) von 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP (11.9 kDa, linke Seite) und Ser-*S*-DptA-PCP1 (12.8 kDa, rechte Seite) nach der Gelfiltration (Superdex 75, GE Healthcare).

Abb. 5.14 zeigt die anschließende HPLC-MS-Analyse von 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP. Die Dekonvolution der Massensignale im Bereich von 500-2000 m/z wurde mit der Software LC/MSD Chemstation (Agilent Technologies) durchgeführt. Durch ein Signal bei 12.2 min mit einer zugehörigen dekonvolutionierten Masse von 11918 Da konnte in der Analyse gezeigt werden, dass das Substrat 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP hergestellt werden konnte. Die Masse des Signals bei 10 min entspricht der *holo*-Form der ACP-Domäne (11806 Da), welche durch Hydrolyse des Thioesters zwischen der prosthetischen Gruppe 4'-Phosphopantethein der PCP-Domäne und der Fettsäure gebildet werden kann (Abb. 5.14B).

Für die Darstellung von Ser-*S*-DptA-PCP1 wurde analog zu der beschriebenen ACP-Beladung verfahren. Nach Inkubation der PCP-Domäne mit Sfp und SerCoA wurde eine Gelfiltration durchgeführt und die Fraktionen mittels SDS-PAGE (Abb. 5.13) analysiert. Analog zu der ACP-Beladung wurden von Ser-*S*-DptA-PCP1 (12.8 kDa) die Fraktionen 38-44 verwendet, da diese keine Bande von Sfp oder anderen Verunreinigungen enthielten. Die Analyse mit HPLC-MS bestätigte die Beladung von DptA-PCP1 mit Serin, wobei auch hier die *holo*-Form der PCP-Domäne aufgrund von Thioesterhydrolyse zu beobachten war (Abb. 5.15).

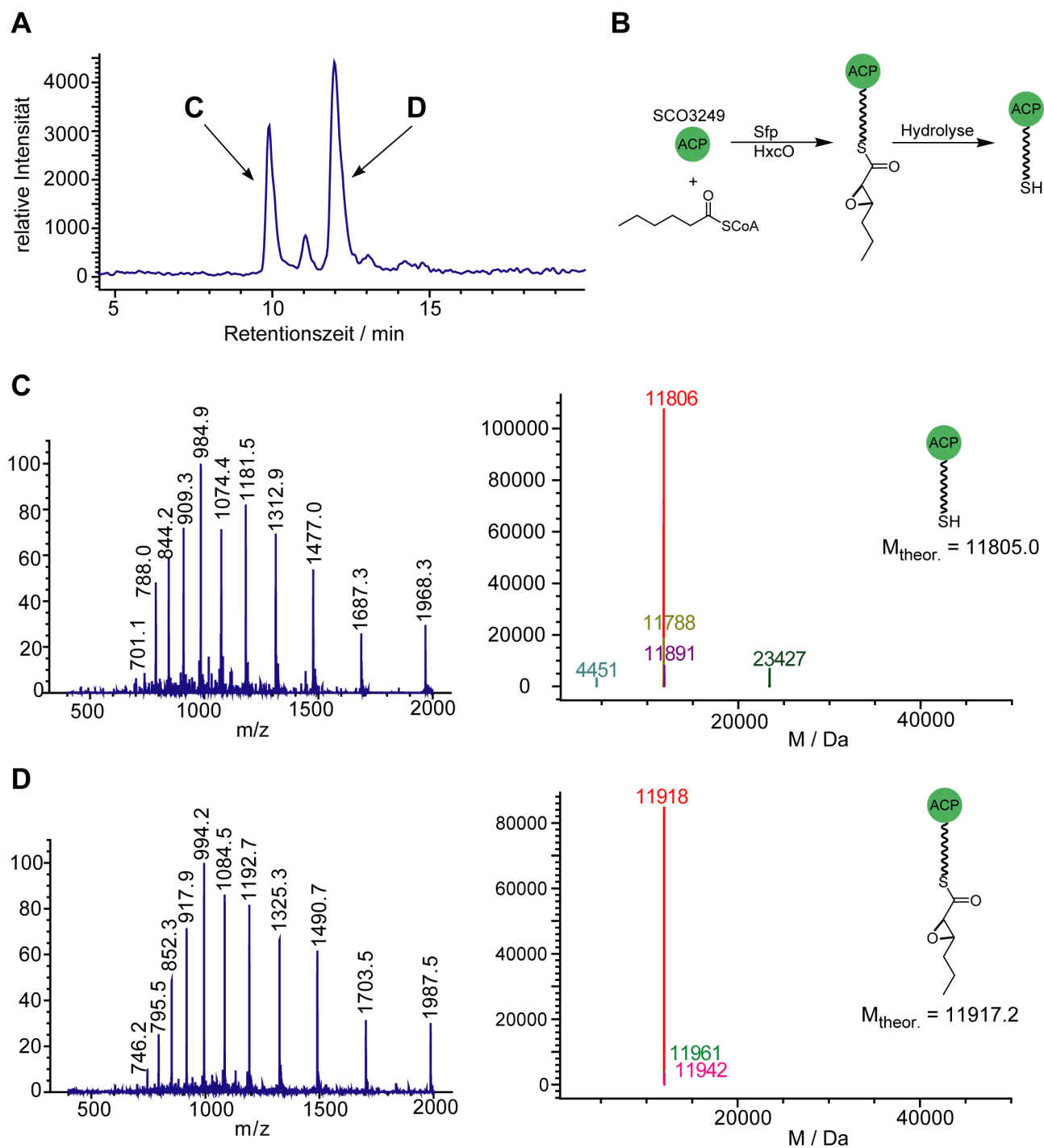


Abb. 5.14: HPLC-MS-Analyse der präparativen Darstellung von 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP nach einer Gelfiltration. Oben ist ein Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms (A) und die Beladungsreaktion mit Sfp und HxcO sowie die als Nebenreaktion auftretende Hydrolyse des gebildeten Thioesters gezeigt (B). In C und D sind die aufgenommenen Massenspektren (links) und die dekonvolvierten Massen (rechts) der im Chromatogramm gekennzeichneten Signale angegeben. Neben dem Signal des FS-S-ACPs (D) ist aufgrund von Hydrolyse der Thioesterbindung auch ein Signal von *holo*-ACP (C) zu beobachten.

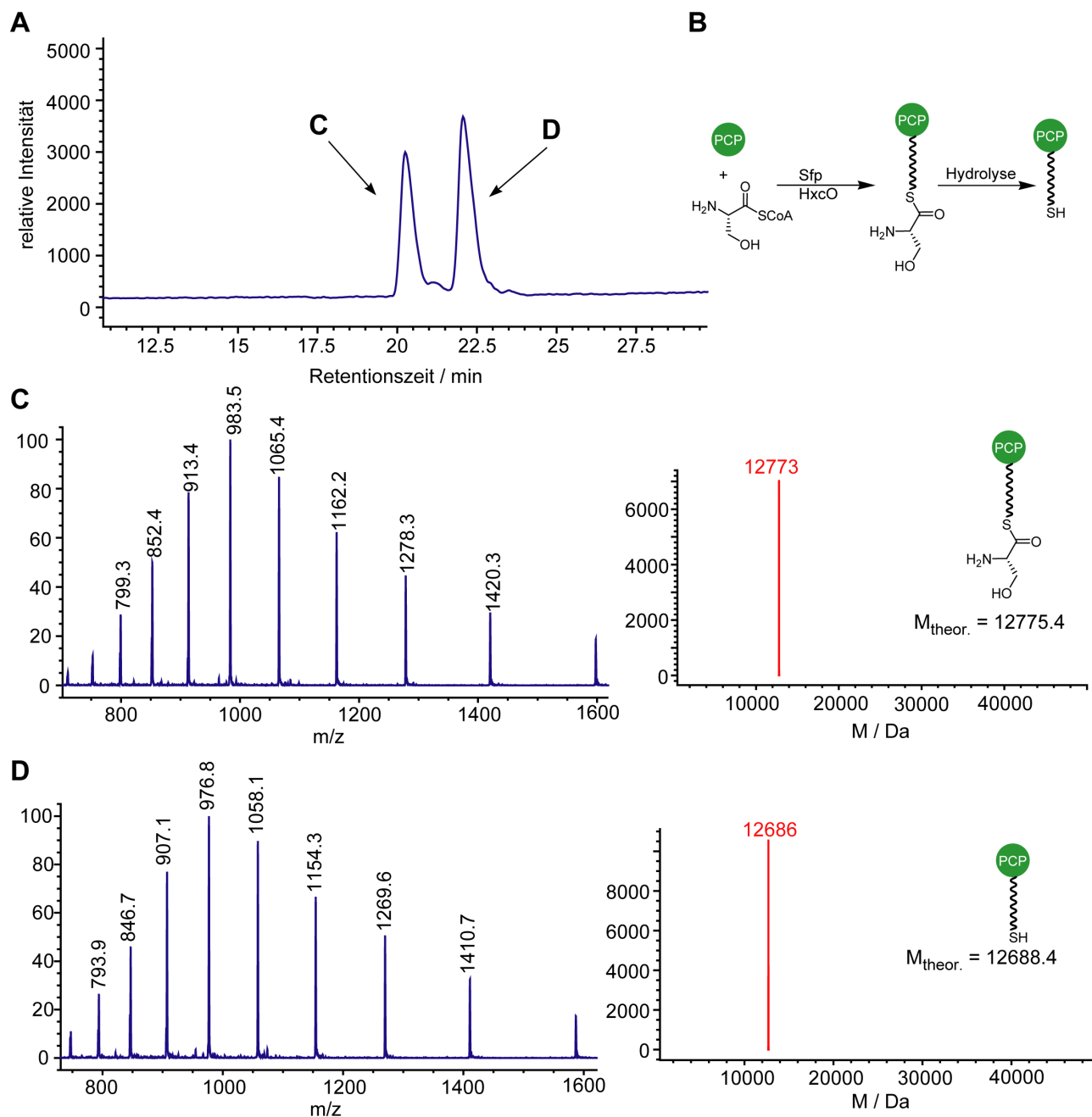


Abb. 5.15: HPLC-MS-Analyse der präparativen Darstellung von Ser-S-DptA-PCP1 nach einer Gelfiltration. Oben ist ein Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms (A) und die Beladungsreaktion mit Sfp (B) sowie die als Nebenreaktion auftretende Hydrolyse des gebildeten Thioesters gezeigt. In C und D sind die aufgenommenen Massenspektren (links) und die dekonvolutionierten Massen (rechts) der im Chromatogramm markierten Signale angegeben. Neben dem Signal von Ser-S-PCP (C) ist aufgrund von Hydrolyse der Thioesterbindung auch ein Signal von *holo*-PCP (D) zu beobachten.

5.2.3 Transfer von 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP durch Katalyse von Cda-C1

Die Carrier-Protein-gebundenen Substrate 2,3-Epoxyhexansäure und Serin wurden nach der Isolierung (s. 5.2.2) mit der rekombinant produzierten Initiations-C-Domäne Cda-C1 inkubiert (s. 4.6.5.2), um die Transferreaktion zu untersuchen. Die Reaktion wurde nach Abbruch mit 10% Ameisensäure (Endkonzentration) via HPLC-MS untersucht. Die Dekonvolution der Massenspektren der Carrier-Proteine erfolgte mit der Software LC/MSD Chemstation (Agilent Technologies) oder bei Messung an einem hochauflösenden Massenspektrometer mit ProMass Deconvolution für Xcalibur Version 2.1. Als Kontrollen dienten Reaktionsansätze ohne Cda-C1.

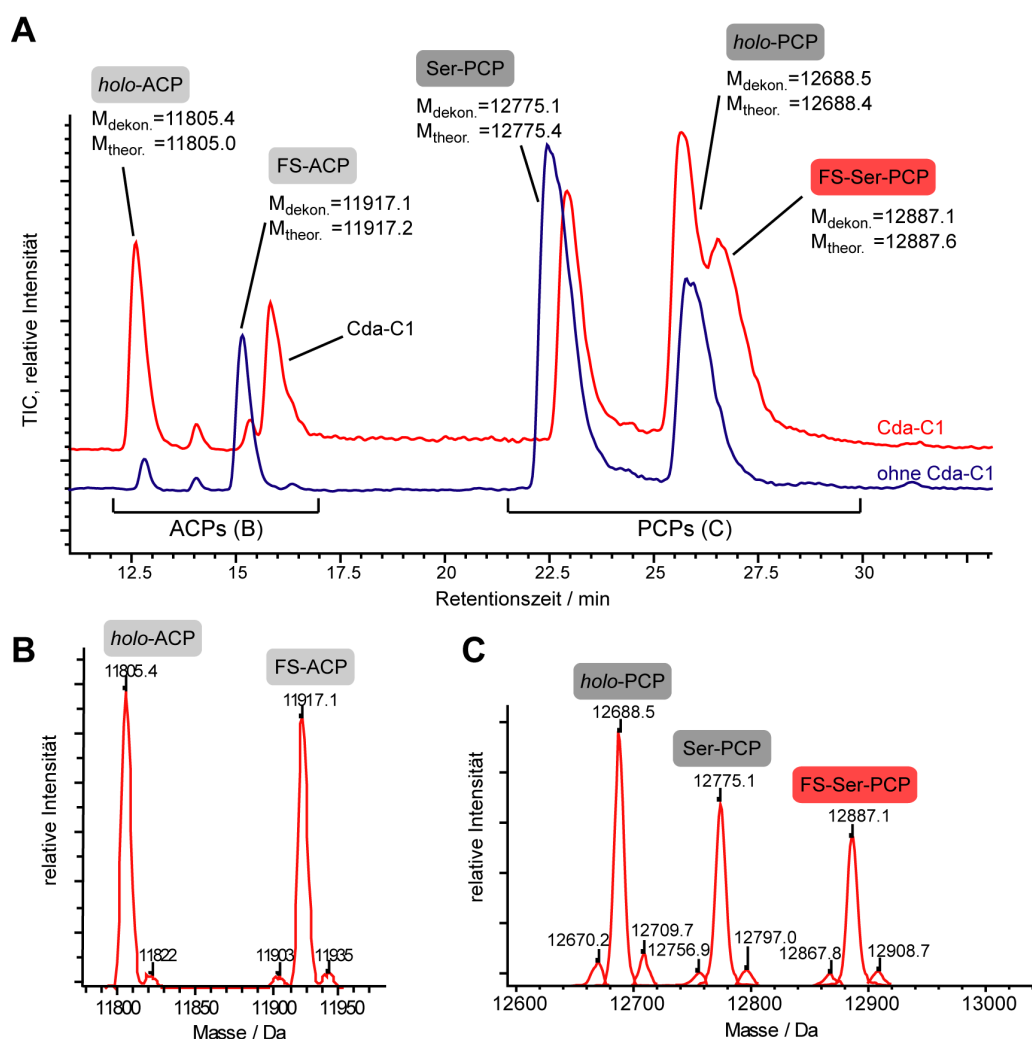


Abb. 5.16: *N*-Acylierung von Ser-S-PCP durch Katalyse von Cda-C1. A: HPLC-Chromatogramm der Übertragungsreaktion mit Cda-C1 (rot) und einer Kontrollreaktion ohne Cda-C1 (blau). Die rekonstruierten Proteingesamtmassen der detektierten Massenspektren der ACP-Formen (12-17 min) sind in B dargestellt, die der PCP-Formen (21.5-30 min) in C. Die Signale sind mit den jeweiligen Massen und zugehörigen Proteinen beschriftet, wobei die Formen der ACP-Domäne in hellgrau, die Formen der PCP-Domäne in dunkelgrau und das *N*-Acylierungsprodukt in rot angezeigt sind. FS: Fettsäure (2,3-Epoxyhexanoylrest).

In Abb. 5.16 sind die HPLC-MS-Analysen der Reaktionen gezeigt. In der Kontrolle ohne Cda-C1 ist bei 15.2 min ein Signal zu beobachten, dessen dekonvolutionierte Masse mit der von 2,3-Epoxyhexanoyl-S-ACP (11917.2 Da) übereinstimmt, neben einem Signal bei 22.7 min mit der zugehörigen Masse von Ser-S-DptA-PCP1 (12775.4 Da) und einem Signal bei 25.8 min mit einer Masse von 12688.5 Da in Übereinstimmung mit der von *holo*-DptA-PCP1. In der Reaktion mit Cda-C1 traten neue Signale bei 16.0 min und bei 26.5 min auf, deren beobachteten Massen mit denen von Cda-C1 und dem erwarteten Kondensationsprodukt 2,3-Epoxyhexanoyl-serinoyl-S-PCP (12887.1 Da) übereinstimmten. Außerdem ist eine deutliche Zunahme des Signals bei 12.6 min mit der dekonvolutionierten Masse von 11805.4 Da zu erkennen, was durch die Akkumulierung von *holo*-ACP (11805.0) zu erklären ist, welches ebenfalls ein Produkt der Übertragungsreaktion ist. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die *N*-Acylierung von Ser-S-PCP nur unter Katalyse von Cda-C1 stattfindet.

Die gewählte Strategie zur Untersuchung der Übertragungsreaktion ermöglichte auch eine Studie der Substratspezifität von Cda-C1. In dieser Reaktion sind vier Substrate beteiligt, die prinzipiell substituiert werden können: Auf der Donorseite der C-Domäne werden das ACP und die daran gebundene Fettsäure erkannt, auf der Akzeptorseite die PCP-Domäne und die dort gebundene Aminosäure. Zur Untersuchung der Spezifität wurde nacheinander jeweils ein Substrat substituiert und in der Übertragungsreaktion (s. 4.6.5.2) eingesetzt.

Während das Peptidyl-Carrier-Protein auf der Akzeptorseite ausgetauscht werden konnte, ohne die *N*-Acylierung von Serin zu unterbinden, fand keine Reaktion mit anderen auf der Donorseite getesteten Acyl-Carrier-Proteinen statt. Die Beladung mit Hexansäure sowie die Epoxidierung mit HxcO konnte erfolgreich für beide alternativ verwendeten ACP durchgeführt werden (s. Tabelle 5.3).

Tab. 5.3: Dekonvolutionierte und erwartete Massen der verwendeten ACP-Formen nach Epoxidierung.

ACP	$M_{\text{exp.}} / \text{Da}$	$M_{\text{theor.}} / \text{Da}$
<i>apo</i> -DptF	13489.4	13490.9
2,3-Epoxyhexanoyl-DptF	13942.6	13943.4
<i>apo</i> -AcpK	11570.8	11572.1
2,3-Epoxyhexanoyl-AcpK	12023.8	12022.3

Jedoch wurde weder DptF aus dem biosynthetischen Gencluster von Daptomycin in *Streptomyces roseosporus*¹⁴⁰ noch AcpK, ein ACP involviert in die Polyketidsynthese aus *Bacillus subtilis*²¹⁹, als

Donor für 2,3-Epoxyhexansäure von Cda-C1 akzeptiert. Dies deutet auf eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen der Donorseite der C-Domäne und dem ACP hin.

Die Spezifität für die CP-gebundenen Substrate war sowohl auf der Donor- als auch auf der Akzeptorseite beschränkt auf die nativen Substrate. Nur 2,3-Epoxyoktansäure auf der Donorseite und Threonin auf der Akzeptorseite wurden von Cda-C1 für die *N*-Acylierungsreaktion akzeptiert (Tabelle 5.4).

Tab. 5.4: Substratspezifität von Cda-C1 für die *N*-Acylierung von Aminoacyl(aa)-PCP. n.d. = nicht detektiert.

		M_{exp.} (Acyl-Ser-PCP) / Da	M_{theor.} (Acyl-Ser-PCP) / Da	Rkt.
Donorseite	Fettsäuren (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-Epoxyhexansäure	12887.1	12887.6	+
	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Epoxyhexansäure	12887.6	12887.6	+
	Hexansäure	n.d.	12871.4	-
	Butansäure	n.d.	12758.4	-
	2,3-Epoxybutansäure	n.d.	12772.4	-
	Oktansäure	n.d.	12899.4	-
	2,3-Epoxyoktansäure	12914.6	12915.6	+
	Dekansäure	n.d.	12927.4	-
	ACP Cda-ACP	12887.1	12887.6	+
	DptF	n.d.	12887.6	-
	AcpK	n.d.	12887.6	-
		M_{exp.} (Epoxyhexanoyl-aa-PCP) / Da	M_{theor.} (Epoxyhexanoyl-aa-PCP) / Da	Rkt.
Akzeptorseite	Ser- <i>S</i> -PCP	12887.1	12887.6	+
	Thr- <i>S</i> -PCP	12900.4	12901.6	+
	Lys- <i>S</i> -PCP	n.d.	12928.2	-
	Asn- <i>S</i> -PCP	n.d.	12914.6	-
	Glu- <i>S</i> -PCP	n.d.	12929.6	-
	Ser- <i>N</i> -PCP	n.d.	12871.6	-
	PCP SrfAA-PCP1	11339.0	11338.2	+
	DptA-PCP1	12887.1	12887.6	+

Die Stereokonfiguration der Epoxygruppe hat vermutlich keinen Einfluss auf die *N*-Acylierungsreaktion, wie durch die Epoxidierung von Hexanoyl-*S*-ACP mit HxcO und HcmO

gezeigt werden konnte. HxcO führt stereospezifisch eine 2*R*,3*S*-konfigurierte Epoxygruppe ein, während HcmO die Bildung des Enantiomers 2*S*,3*R*-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP katalysiert.¹³⁹ Für beide Substrate konnte das Kondensationsprodukt mit Serin beobachtet werden, wobei ein quantitativer Vergleich nicht möglich war, da das Substrat von HcmO, 2-Hexenoyl-*S*-ACP, aufgrund der Doppelbindung leichter Nebenreaktionen wie z.B. die Addition von Wasser eingehen kann und somit ein Teil des eingesetzten Substrats nicht epoxidiert wurde und damit auch nicht für die *N*-Acylierung zur Verfügung steht.

Zudem wurde das Substratanalogon Serin-Amino-CoA bei der Beladung von DptA-PCP1 verwendet, um bei einer Übertragungsreaktion eine Quantifizierung zu ermöglichen, da dieses Produkt keiner Hydrolyse von der PCP-Domäne unterliegt. Die Beladung durch Sfp zur Darstellung von Ser-*N*-PCP war erfolgreich, allerdings konnte keine *N*-Acylierung dieses Substrats beobachtet werden, wodurch eine quantitative Verfolgung der Übertragungsreaktion wegen Nebenreaktionen wie der Hydrolyse des Thioesters nicht möglich war.

5.2.4 Untersuchung der Varianten von Cda-C1

Wie für die Lipoinitiation in der Surfactin-Biosynthese wurden auch von der Initiations-C-Domäne Cda-C1 Varianten hergestellt, in denen das katalytische Kernmotiv HHxxxDG verändert wurde. Dafür wurden die Varianten H156A und H157A nach 4.1.5 hergestellt, produziert und gereinigt.

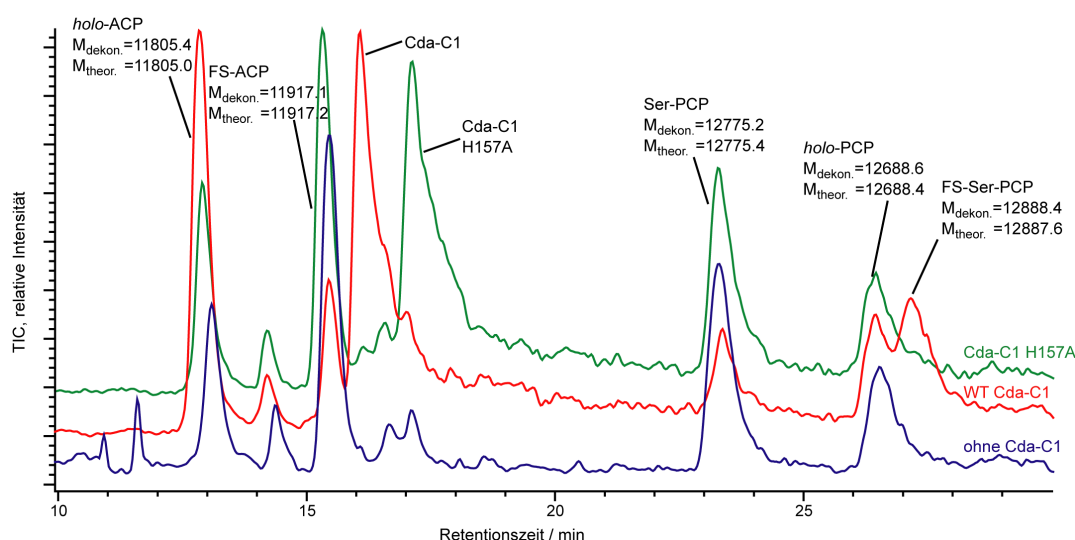


Abb. 5.17: HPLC-MS-Analyse der *N*-Acylierung von Ser-*S*-DptA-PCP1 durch Cda-C1 (rot) und der Variante Cda-C1 H157A (grün). Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Cda-C1 (blau). Die Signale sind mit den experimentell bestimmten und den theoretischen Massen des zugehörigen Carrier-Proteins beschriftet. FS: Fettsäure (2,3-Epoxyhexanoylrest).

Bei der Substitution des ersten Histidins H156 gegen Alanin wurde das Protein nicht erhalten, da die Variante unter verschiedenen Expressionsbedingungen unlöslich war. Die Variante H157A dagegen konnte in ähnlichen Ausbeuten wie der Wildtyp erhalten werden und wurde analog in der Übertragungsreaktion eingesetzt (Abb. 5.17). Es konnte jedoch wie erwartet kein Kondensationsprodukt 2,3-Epoxyhexanoyl-serinoyl-S-PCP detektiert werden.

5.3 Untersuchungen der artifiziell singulären Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2

Die Trennung der Initiations-C-Domänen SrfAA-C1 und Cda-C1 von dem Modulverband ermöglichte eine ausführliche Aufklärung und *in vitro* Studie der katalysierten Reaktionen. C-Domänen, die eine Peptidbindungsbildung katalysieren, und verwandte Domänen wie C/E-Dual-Domänen oder Cy-Domänen wurden bereits in einigen Studien im Zusammenhang mit den umgebenden Domänen untersucht.^{61-62,111,114,119-120,220} Detailliertere Untersuchungen wie Substratspezifität sind jedoch im Modulverband schwieriger durchzuführen als mit alleinstehenden Domänen. Am Beispiel der Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2 wird in den folgenden Abschnitten gezeigt, dass die Bestimmung von Substratspezifität und Protein-Protein-Interaktionen durch Trennung der Domäne von dem Modulverband prinzipiell möglich ist. Dazu wurde die Zyklisierungs-Domäne aus der Bacitracin-Synthetase BacA aus *Bacillus licheniformis* rekombinant produziert, ebenso wie die darauffolgenden Domänen BacA-APCP2 und die vorhergehende PCP-Domäne BacA-PCP1.

Die Reaktion der Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2 wurde bereits von Duerfahrt *et al.* im Zusammenhang der ersten beiden Module der NRPS BacA (A-PCP-Cy-A-PCP) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Cy-Domäne zunächst die Peptidbindungsbildung zwischen Isoleucin und Cystein katalysiert und anschließend die Thiazolin-Bildung des Cysteinrests erfolgt.¹¹⁹ Duerfahrt *et al.* konnten zwei Aminosäurenreste (N900 und S984) identifizieren, die notwendig für die Zyklisierung sind, jedoch keinen Einfluss auf die Peptidbindungsbildung haben.

5.3.1 Heterologe Expression und Reinigung von *bacA-PCP1*, *bacA-APCP2* und *bacA-Cy2*

Die Genfragmente *bacA-PCP1*, *bacA-APCP2* und *bacA-Cy2* wurden in das Vektorsystem pET28a(+) kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die rekombinanten His₆-Tag-Fusionsproteine wurden mittels IMAC (s. 4.2.3) gereinigt und mit SDS-PAGE (Abb. 5.18) sowie

Peptidmassen-Fingerabdruck (s. 4.3.2) analysiert und identifiziert. BacA-Cy2 wurde zusätzlich über eine Gelfiltration gereinigt, um missgefaltete Aggregate des Proteins abzutrennen. Es wurden zwei Signale beobachtet, deren Fraktionen beide BacA-Cy2 enthielten (im folgenden mit Charge 1 und 2 bezeichnet). Nach Vergleich mit der Kalibration der Gelfiltrationssäule entsprach das zweite Signal dem Molekulargewicht des Monomers von BacA-Cy2 (Charge 2). Beide Chargen wurden getrennt voneinander weiterverwendet. Die Proteine wurden in folgenden Ausbeuten pro Liter Zellkultur erhalten: 4.6 mg BacA-PCP1, 6.3 mg BacA-APCP2 und 1.8 mg BacA-Cy2.

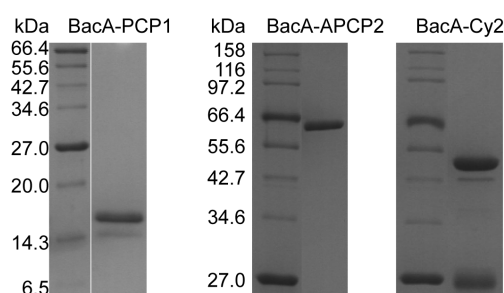


Abb. 5.18: SDS-PAGE-Analyse von BacA-PCP1 (13.6 kDa), BacA-APCP2 (68.5 kDa) und BacA-Cy2 (52.5 kDa). Als Marker wurde der Protein Marker Broad Range (2-212 kDa, New England BioLabs) verwendet.

5.3.2 Untersuchung der Zyklisierungsreaktion durch BacA-Cy2

Für die Untersuchung der Cy-Domäne BacA-Cy2 wurden zunächst die Substrate für diese Reaktion generiert. BacA-PCP1 wurde dafür mit chemisch synthetisiertem Leucin-CoA (s. 4.5.1) durch Inkubation mit Sfp beladen, während BacA-APCP2 durch A-Domänen-Katalyse mit Cystein beladen wurde (s. 4.6.6). Anschließend wurden die beladenen Proteine (Leu-BacA-PCP1 und Cys-BacA-APCP2) mit BacA-Cy2 inkubiert (s. 4.6.6). Die PCP-Substrat-Thioester wurden entweder mit KOH (s. 4.6.3) oder durch Zugabe der externen Thioesterase SrfTEII (s. 4.6.2.2) hydrolysiert, um die Substrate anschließend mit HPLC-MS nach 4.6.6 zu analysieren. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe der Cy-Domäne durchgeführt. In der Reaktion in Anwesenheit der Cy-Domäne ist ein Signal bei 19.7 min zu beobachten, dessen zugehörige Masse $m/z = 217.1$ ist und mit dem erwarteten Reaktionsprodukt Leu-Cys_{Thiazolin} ($m/z_{\text{theor.}} = 217.09 [M+H]^+$) übereinstimmt (Abb. 5.19). Ein weiteres Signal mit der Masse $m/z = 320.1$ ist bei 21.5 min zu erkennen, das mit der Masse eines Tripeptids Leu-Cys_{Thiazolin}-Cys übereinstimmt. Dies kann durch eine bereits bekannte Nebenreaktion des PCP-gebundenen Produkts mit freiem Cystein entstehen, wenn eine Transthiolierung durch die reaktive Thiolgruppe von Cystein stattfindet.¹¹⁹ Beide Signale sind in der Negativ-Kontrolle ohne BacA-Cy2 nicht zu beobachten, was eine Katalyse der Reaktion durch die

Cy-Domäne bestätigt. Das Reaktionsprodukt konnte nur in Anwesenheit des Monomers von BacA-Cy2 (Charge 2) beobachtet werden, wurde das aggregierte Protein nach der Gelfiltration verwendet (Charge 1), wurde keine Produktbildung beobachtet.

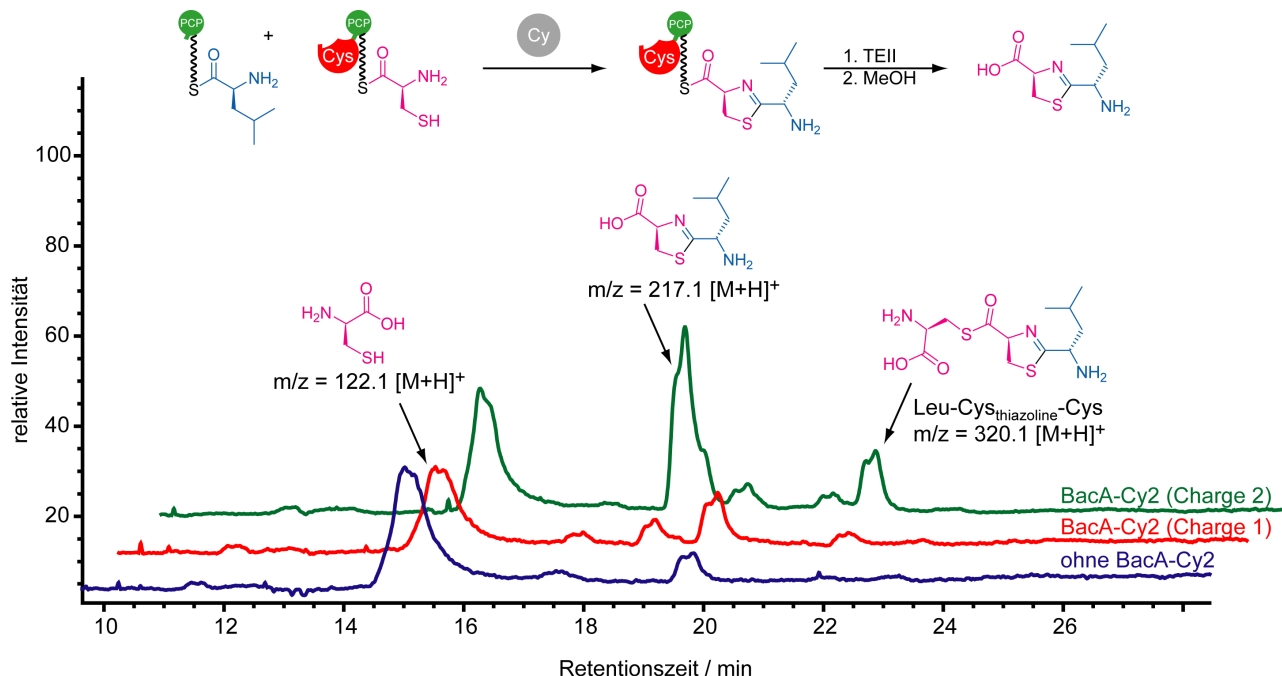


Abb. 5.19: HPLC-Chromatogramm der oben schematisch dargestellten Zyklisierungsreaktion durch BacA-Cy2. Gezeigt sind die Chromatogramme einer Reaktion ohne BacA-Cy2 (blau), mit dem aggregierten Protein (Charge 1 aus der Gelfiltration, rot) und mit dem Monomer von BacA-Cy2 (Charge 2 aus der Gelfiltration, grün). Die Signale wurden im positiven *single-ion*-Modus aufgenommen.

In weiteren Experimenten wurde die Substratspezifität untersucht. Dabei wurde BacA-PCP1 durch andere PCP-Domänen ersetzt, außerdem Leucin gegen verschiedene Aminosäuren und auf der Akzeptorseite wurde Cystein gegen Threonin und Serin substituiert, die prinzipiell zur Ausbildung eines Oxazolins befähigt sind. Für die Beladung der PCP-Domänen wurden chemisch synthetisierte CoA-Derivate der Aminosäuren (s. 4.5.1) verwendet.

Es konnten jedoch keine Zyklisierungsprodukte für die verwendeten Substrate beobachtet werden (Tabelle 5.5). Auch die Substitution von BacA-PCP1 durch fremde PCP-Domänen führte nicht zum zyklisierten Kondensationsprodukt, was auf eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen der Cy-Domäne und BacA-PCP1 hindeutet.

Tab. 5.5: Substratspezifität von BacA-Cy2. Detektierte zyklisierte Dipeptide sind mit „+“ angedeutet, nicht detektierte Produkte mit „-“.

Donorseite				Akzeptorseite	
Aminosäure	Reaktion	PCP-Domäne	Reaktion	Aminosäure	Reaktion
Leucin	+	BacA-PCP1	+	Cystein	+
Serin	-	SrfAA-PCP1	-	Threonin	-
Phenylalanin	-	SrfAA-PCP2	-	Serin	-
Asparagin	-	DptA-PCP1	-		
Arginin	-				
Lysin	-				

6 Diskussion

6.1 Aufklärung der Lipoinitiation in der Surfactin-Biosynthese

Das Lipoheptapeptid Surfactin aus *Bacillus subtilis* gehört zu den Vertretern der nichtribosomal synthetisierten Peptide (s. 1.2.1). Surfactin enthält einen Fettsäurerest, der die Eigenschaften des Lipopeptids maßgeblich beeinflusst und dem Molekül amphiphilen Charakter verleiht.^{74,221-222} Dieser amphiphile Charakter sorgt für seine Eigenschaften als exzellentes Biotensid und hat Einfluss auf seine antibakterielle Wirkung. Der Einbau der Fettsäure ist somit ein entscheidender Schritt in der Biosynthese von Surfactin und wurde in dieser Arbeit eingehend untersucht. Die Aktivierung der Fettsäure und deren Transfer auf die α -NH₂-Gruppe der N-terminalen Aminosäure Glutaminsäure werden als Lipoinitiation der Biosynthese von Surfactin bezeichnet. Die bereits vorgestellten Ergebnisse zur Untersuchung dieser Reaktionen werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

6.1.1 Fettsäureaktivierung durch *in trans* wirkende Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen

Die Carboxylgruppe einer Fettsäure ist gegenüber nukleophilen Angriffen bedingt durch die gute Resonanzstabilisierung wenig reaktiv und muss daher zunächst aktiviert werden, was häufig durch Verknüpfung mit einer geeigneten Abgangsgruppe einhergeht. In der Zelle wird diese Aktivierung meist durch Adenylierung, Phosphorylierung oder Thioesterbildung mit Coenzym A oder Carrier Proteinen realisiert, die durch spezifische Enzyme verschiedener Klassen katalysiert wird. Der Gencluster für die Biosynthese von Surfactin enthält neben den drei NRPS-Genen nur ein anderes Gen, welches jedoch für die externe Thioesterase Srf-TEII (oder SrfAD) kodiert (Abb. 1.15). Enzyme oder Carrier Proteine, die mit der Fettsäureaktivierung in Verbindung gebracht werden könnten, sind durch Homologie-Untersuchungen in der Umgebung der NRPS-Gene *srfAA-srfAC* im Genom von *Bacillus subtilis* nicht zu finden (Abb. 1.15). Daher wurde angenommen, dass die Aktivierung der Fettsäure für den Einbau in den Sekundärmetaboliten Surfactin durch Enzyme aus anderen Synthesewegen der Zelle übernommen wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Biosynthese von Surfactin durch SrfAA, SrfAB und SrfAC in Anwesenheit einer CoA-aktivierten 3-Hydroxyfettsäure initiiert werden kann. Daher wurden in früheren Studien vier putative Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL) identifiziert und untersucht, deren Ergebnisse den Ausgangspunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Studien dieser Enzyme bildeten.²¹⁶⁻²¹⁷ Die vier Enzyme LcfA, YhfL,

YhfT und YngI zeigen in Homologie-Untersuchungen eine hohe Ähnlichkeit zu der Klasse der langkettigen Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (s. 5.1.2), die unter Verbrauch von ATP den Transfer von langkettigen Fettsäuren auf Coenzym A katalysieren (s. 1.3), weswegen die identifizierten Enzyme für die Aktivierung der Fettsäure für die Surfactin-Biosynthese in Frage kommen. Diese vier Enzyme wurden für *in vitro* Studien heterolog produziert und gereinigt, wobei die Enzyme YhfL und YngI als Fusionsprotein mit Thioredoxin erhalten wurden (s. 5.1.1). Die Analyse mit SDS-PAGE und Peptidmassen-Fingerabdruck konnte die Reinheit und Identität der vier FACL LcfA, YhfL, YhfT und YngI eindeutig bestätigen, wodurch Rückschlüsse der erhaltenen Ergebnisse der *in vitro* Studien auf die Katalyse dieser Enzyme zulässig sind. Es konnte gezeigt werden, dass LcfA und YhfL die Übertragung einer Reihe von Fettsäuren der Länge von 8-14 Kohlenstoffen auf Coenzym A katalysieren (Tab. 5.1, Abb. 6.1). Die Präsenz einer 3-Hydroxygruppe scheint dabei keinen Einfluss auf die Reaktion zu haben.

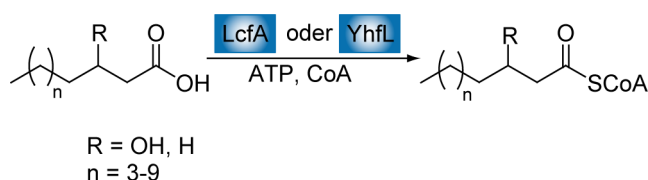


Abb. 6.1: Fettsäureaktivierung durch Ausbildung eines Thioesters mit CoA unter Katalyse von LcfA oder YhfL.

Für YhfT konnte nur das Reaktionsintermediat, das Acyladenylat, beobachtet werden, was durch Wahl des falschen Substrats oder ungeeigneter Reaktionsbedingungen erklärt werden könnte. YngI zeigte keine Aktivität in den gewählten Bedingungen, was ebenfalls an ungeeigneten Reaktionsbedingungen oder Puffersystemen liegen könnte oder an einer Inaktivierung des Enzyms durch die Fusionierung mit Thioredoxin. LcfA und YhfL, deren Aktivität *in vitro* gezeigt werden konnte, besitzen von den betrachteten vier FACL aus *Bacillus subtilis* die höchste Homologie zu der gut untersuchten FACL FadD aus *E. coli* und zeigen auch eine hohe Homologie untereinander (s. 5.1.2). Die geringere Übereinstimmung des FACL-Motivs in der Sequenz von YhfT und YngI (Abb. 5.2) könnte bedeuten, dass diese Enzyme andere Substrate als LcfA und YhfL erkennen und daher keine Übertragung der getesteten Fettsäuren auf CoA durch diese beiden Enzyme beobachtet werden konnte. Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um diese Vermutungen zu überprüfen.

Die Transkription der Gene *lcfA* und *yhfL* steht in *B. subtilis* unter Kontrolle von YsiA, einem Repressor-Protein, das die Transkription von fünf Operons mit mehr als zehn Genen reguliert, deren kodierte Proteine höchstwahrscheinlich in der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind.¹⁹¹ LcfA

und YhfL sorgen dabei vermutlich für die Bereitstellung von CoA-Thioestern der abzubauenen Fettsäuren. Die beobachtete breite Substratspezifität der Enzyme ist in dieser Funktion wichtig, um der Zelle möglichst viele Fettsäuren als potentielle Energielieferanten zur Verfügung zu stellen und ist bekannt für diese Klasse von Enzymen.¹⁹⁹

Youssef *et al.* zeigten kürzlich, dass die Infunktionalisierung von YbdT, einem Cytochrom P450 in *Bacillus subtilis* OKB105, den Anteil von nicht hydroxylierten Surfactin-Derivaten von 61% auf 95.6% der gesamt produzierten Biosurfactanten erhöhte und legten damit nahe, dass YbdT die benötigten 3-Hydroxyfettsäuren für die Produktion von Surfactin bereitstellt.²²³ Desweiteren ist bekannt, dass YbdT stereospezifisch *R*-konfigurierte Hydroxygruppen an der β -Position in langkettige Fettsäuren einführt.²²⁴ In Surfactin wurden ebenfalls ausschließlich *R*-konfigurierte Fettsäurereste beobachtet, außerdem konnte für die Zyklisierung während der Biosynthese von Bruner *et al.* gezeigt werden, dass die Lactonbildung in der TE-Domäne ausschließlich mit *R*-konfigurierten 3-Hydroxygruppen stattfindet.⁹² In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LcfA und YhfL auch 3-Hydroxyfettsäuren als CoA-Thioester aktivieren und damit die These stützen, dass YbdT zunächst die Hydroxygruppe einführt, dann die Aktivierung durch verschiedene FACL und anschließend die Übertragung auf die Surfactinsynthetase SrfAA erfolgt.

Um die Beteiligung der untersuchten FACL an der Surfactin-Biosynthese eingehender zu überprüfen, wurden Deletionsmutanten der vier FACL des Surfactinproduzenten *Bacillus subtilis* OKB105 generiert und deren Surfactinproduktion *in vivo* untersucht. Die Ergebnisse (s. 5.1.3) zeigten eine deutliche Reduktion der Surfactinproduktion bei Deletion von drei oder vier Genen der FACL LcfA, YhfL, YngI und YhfT (Abb. 5.6) um bis zu 84% verglichen mit der produzierten Menge des Wildtyps. Die Doppel- oder Einfachmutanten zeigten nur eine Reduktion der Surfactinmenge um 10-65%, was deutlich dafür spricht, dass die Enzyme sich bei der Bereitstellung der Fettsäure für die Surfactin-Biosynthese ergänzen und zumindest teilweise redundant sind. Von den vier Einfachdeletionen zeigten die von *yngI* und *yhfL* den geringsten Einfluss. Dies deutet darauf hin, dass diese Enzyme ebenfalls in die Biosynthese von Surfactin involviert sind, auch wenn ihre Aktivität *in vitro* nicht geklärt werden konnte. Die Tripelmutante $\Delta yhfL \Delta yngI \Delta yhfT$, zeigt eine deutlich höhere Produktion (66% des Wildtyp-Levels) als die restlichen Tripelmutanten (20 bzw. 36%), was dafür spricht, dass LcfA einen Großteil der für Surfactin benötigten Fettsäuren aktiviert. Die Deletionsmutante $\Delta lcfA$ zeigt passend zu dieser Annahme eine starke Reduktion der Surfactin-Produktion um 54% (im Vergleich dazu $\Delta yngI$ und $\Delta yhfT$ nur um 38% bzw. 47%).

Bei Deletion aller vier Gene der untersuchten FACL wurde die Surfactin-Produktion auf ein

Minimum von 16% des Wildtyp-Levels vermindert. Da die Produktion jedoch nicht vollständig aufgehoben wurde, ist davon auszugehen, dass die Bereitstellung der aktivierten Fettsäure in der Zelle durch weitere Mechanismen erreicht werden kann. Dies könnte unter anderem durch Transthiolierung von ACP-gebundenen Fettsäuren auf Coenzym A stattfinden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, ob nicht auch andere Aktivierungsformen der Fettsäure wie z. B. Acyladenylate oder ACP-gebundene Fettsäuren die Surfactinsynthese durch Übertragung auf SrfAA initiieren können. Trotzdem sind nach den hier erhaltenen Ergebnissen die vier untersuchten FACL der Hauptreaktionspfad zur Aktivierung der Fettsäuren für die Biosynthese von Surfactin.

6.1.2 Fettsäuretransfer durch Katalyse der Initiations-C-Domäne SrfAA-C1

Es wurde bereits gezeigt, dass 3-Hydroxymyristoyl-CoA die Surfactin-Synthese durch Übertragung des Fettsäurerests auf SrfAA-gebundenes Glutamat startet.^{157,216} In dieser Arbeit wurde dieses Wissen durch eingehendere Untersuchungen des Initiationsmoduls SrfAA-M1 und der Initiations-C-Domäne SrfAA-C1 erweitert. Die Übertragung der aktivierten Fettsäure wurde in Anwesenheit des mit Glutaminsäure beladenen Moduls SrfAA-M1 beobachtet, wobei entweder chemisch synthetisiertes 3-Hydroxymyristoyl-CoA verwendet wurde, oder eine *in situ* Aktivierung von 3-Hydroxymyristinsäure durch die FACL LcfA oder YhfL erreicht wurde. In beiden Fällen wurde die Bildung des *N*-acylierten Glutamats beobachtet, ohne dass die Anwesenheit einer externen Acyltransferase notwendig war (s. 5.1.4.1). Steller *et al.* beobachteten einen stimulierenden Effekt der externen Thioesterase Srf-TEII auf die Initiation der Surfactinsynthese und postulierten, dass Srf-TEII neben bereits gezeigten Reparaturfunktionen von misacylierten PCP-Domänen¹⁰⁰ auch die Funktion einer Acyltransferase in der Initiation der Surfactin-Biosynthese übernimmt.¹⁵⁷ Jedoch konnten sie nicht zweifelsfrei zeigen, dass der positive Effekt auf die Fettsäureübertragung von einer Acyltransferasen-Aktivität von Srf-TEII herrührt und nicht etwa von der Regeneration des Moduls durch Hydrolyse des Produkts 3-Hydroxymyristoyl-Glutamat, wodurch das Modul einen neuen Katalysezyklus eingehen könnte. Um die Transferreaktion und den Ursprung der Katalyse näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die einzelnen Domänen des Initiationsmoduls artifiziell von den umgebenden Domänen getrennt. Dazu wurde sowohl das Genfragment der PCP-Domäne als auch der C-Domäne alleinstehend kloniert, heterolog exprimiert und gereinigt (s. 5.1.1 und Abb. 6.2).

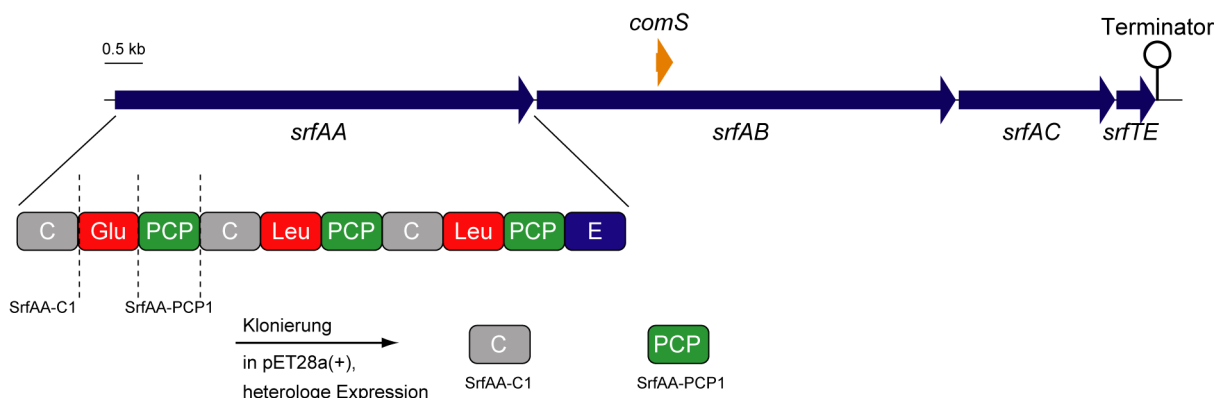


Abb. 6.2: Biosynthetisches Gencluster von Surfactin aus *Bacillus subtilis*. Die Domäneneinteilung der NRPS SrfAA ist schematisch dargestellt und die artifizielle Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten Domänen SrfAA-C1 und SrfAA-PCP1 durch gestrichelte Linien angedeutet. *comS* ist an der Regulation der genetischen Kompetenz von *B. subtilis* beteiligt.¹⁵⁸

Eine C-Domäne im Initiationsmodul ist für die meisten nichttribosomal synthetisierten Peptide eher ungewöhnlich, da die N-terminale Aminosäure des Peptids nur über die Carboxylgruppe mit der darauffolgenden Aminosäure verknüpft werden muss, was normalerweise durch die *downstream* liegende C-Domäne des nächsten Moduls übernommen wird. Liegt der N-Terminus des Naturstoffs jedoch acyliert vor, wie z. B. in Lipopeptiden, ist wie bereits in 1.2 beschrieben häufig eine sogenannte Initiations-C-Domäne im ersten Modul der NRPS zu finden⁷⁷, von der zu Beginn dieser Arbeit angenommen wurde, dass diese für die *N*-Acylierung der ersten Aminosäure des Peptids zuständig ist. Die Analyse des Fettsäuretransfers von 3-Hydroxymyristoyl-CoA auf PCP-gebundenes Glutamat in Anwesenheit der rekombinanten C-Domäne SrfAA-C1 bestätigte diese Vermutung (s. 5.1.4.2). Während in Anwesenheit von SrfAA-C1 ein deutliches Signal des Kondensationsprodukts 3-Hydroxymyristoyl-Glutamat in der mit HPLC-MS analysierten Reaktion beobachtet werden konnte, wurde das *N*-acylierte Produkt in der Kontrollreaktion ohne SrfAA-C1 nicht beobachtet (s. Abb. 5.8). Diese Beobachtung verdeutlicht die Notwendigkeit der Initiations-C-Domäne für den Fettsäuretransfer und beweist die Funktion von SrfAA-C1 als Acyltransferase in der Lipoinitiationsreaktion von Surfactin. Weitere Studien mit Varianten von SrfAA-C1, in denen das für C-Domänen typische Katalysemotiv HHxxxDG verändert wurde, bestätigen ebenfalls die Acyltransferasen-Aktivität von SrfAA-C1: Die Substitution des zweiten Histidins H140 gegen Alanin, Lysin oder Aspartat führt zu einem Verlust der katalytischen Aktivität (s. 5.1.5).

Die Beladung der PCP-Domäne durch Sfp mit chemisch synthetisierten Aminoacyl-CoA-Derivaten wurde bereits von Belshaw *et al.* beschrieben und dafür genutzt, die A-Domäne und deren

ausgeprägte Spezifität bei der Substratbereitstellung zu umgehen.⁶¹ Auch in dieser Arbeit wurde die PCP-Domäne über diese Methode entweder mit dem nativen Substrat Glutaminsäure oder zur Untersuchung der Spezifität von SrfAA-C1 mit weiteren Aminoacyl-CoA-Thioestern beladen. Bisherige Untersuchungen einiger Elongations-C-Domänen ergaben, dass auf der Akzeptorseite eine ausgeprägte Spezifität für die gebundene Aminosäure und deren Konfiguration vorhanden ist.^{61,63,111-112} Dies wurde auch für die *N*-Acylierungsreaktion von Glutamat durch SrfAA-C1 festgestellt, neben Glutamat und Asparagin konnte für kein anderes Aminoacyl-S-PCP die Bildung des entsprechenden Kondensationsprodukts festgestellt werden (s. Tabelle 5.2, Substrat 2 in Abb. 6.3).

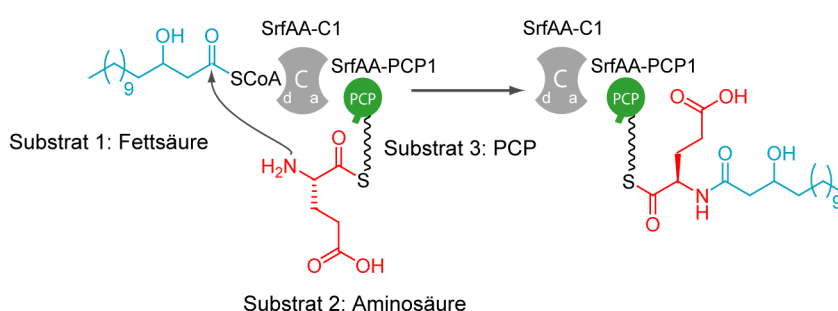


Abb. 6.3: Lipoinitiationsreaktion durch Katalyse von SrfAA-C1. Zur Untersuchung der Substratspezifität von SrfAA-C1 wurde die Fettsäure (blau), die PCP-gebundene Aminosäure (rot) und die PCP-Domäne selbst (grün) gegen verschiedene Substrate substituiert. Die Bindungsstellen der C-Domäne sind mit den Buchstaben d (Donorseite) und a (Akzeptorseite) angedeutet.

Während dieser Promotionsarbeit wurde von Kathrin Hnida im Rahmen ihrer Masterarbeit auch die Toleranz von SrfAA-C1 hinsichtlich der Länge des PCP-gebundenen Substrats untersucht, jedoch konnte auch für die verwendeten Dipeptide Glu-X (X = Leu, Gly) keine Acylierung beobachtet werden.²²⁵ Die Länge des Aminoacyl-Thioesters spielt also auch eine entscheidende Rolle und deutet zusammen mit den hier gewonnen Erkenntnissen auf eine für das Substrat äußerst spezifisch ausgebildete Bindungstasche der Akzeptorseite von SrfAA-C1 hin.

Das verwendete Carrier-Protein auf der Akzeptorseite hingegen konnte ohne die Produktbildung zu beeinflussen ausgetauscht werden (s. Tabelle 5.2, Substrat 3 in Abb. 6.3), was auf eine nicht allzu spezifische Wechselwirkung der C-Domäne mit der PCP-Domäne hindeutet. Die dreidimensionale Struktur von bekannten PCP-Domänen ähnelt sich sehr stark, ihnen ist die Faltung in ein 4-Helix-Bündel gemein und sie nehmen definierte Konformationen ein (s. 1.1.1.2).^{54,99} Es ist daher plausibel, die Domänen-Interaktion auf universelle PCP-Strukturelemente zurückzuführen. Beachtet man die außerordentliche Länge des Ppant-Arms, ist es außerdem möglich, dass die Interaktion überwiegend

mit dem Kofaktor und dem daran gebundenen Rest stattfindet neben einer eher schwachen Interaktion mit der PCP-Domäne selbst und die PCP-Domäne daher ohne Einfluss auf die Interaktion und Katalyse substituiert werden kann. Bei diesen Betrachtungen sollte berücksichtigt werden, dass diese beiden Domänen im nativen System auf einer Peptidkette vorliegen und die räumliche Nähe zwischen Substrat und aktiver Tasche der C-Domäne daher schon durch die Proteinfaltung und der in diesem Rahmen möglichen Domänenbewegung hergestellt werden kann, ohne eine besonders starke Domänen-Interaktion zu erfordern. Die gezeigte Toleranz der C-Domäne könnte in zukünftigen *domain swapping* Strategien von Nutzen sein, da die Interaktion mit fremden Domänen prinzipiell möglich ist. So müssten nur Spezifitätsprobleme mit den gebundenen Substraten in zukünftigen Studien überwunden werden.

Für die Donorseite ist bei einigen Elongations-C-Domänen berichtet worden, eine eher relaxierte Substratspezifität gegenüber des Aminoacyl- oder Peptidylrests auf der *upstream* gelegenen PCP-Domäne aufzuweisen.^{61,113,122,226} Eine Ausnahme bilden ^DCL-Domänen, also C-Domänen die eine D-Aminosäure mit einer L-Aminosäure verknüpfen und daher in der NRPS-Abfolge meist auf E-Domänen folgen. Diese zeigen auf ihrer Donorseite eine ausgeprägte Spezifität für das D-konfigurierte Substrat.⁶² Die hier untersuchte Initiations-C-Domäne SrfAA-C1 wies eine hohe Substratspezifität auf der Donorseite auf. Sowohl die Länge der CoA-aktivierten Fettsäure als auch die 3-Hydroxygruppe werden durch SrfAA-C1 erkannt. Diese eher ungewöhnliche Spezifität auf der Donorseite macht evolutionär gesehen für die Produktion von Surfactin Sinn, da das Substrat CoA-aktiviert vorliegt und die Initiations-C-Domäne daher aus dem großen zellulären Pool der vorhandenen CoA-Thioester auswählen muss. Die Übertragung eines falschen Acylrests könnte dabei die Fertigstellung der energieaufwendigen Synthese von Surfactin verhindern, da die 3-Hydroxygruppe für die Lactonbildung und somit für die korrekte Produktbildung erforderlich ist. Die hier gewonnenen Erkenntnisse aus den Mutationsstudien von SrfAA-C1 bestätigen frühere Studien an anderen C-Domänen, in denen die Notwendigkeit des hochkonservierten Motivs HHxxxDG für die katalytische Aktivität festgestellt wurde.^{58,76,215} Auch in Initiations-C-Domänen wie SrfAA-C1 ist das zweite Histidin des Kernmotivs für die katalytische Aktivität essentiell, während das erste Histidin gegen das unreaktive Alanin substituiert werden konnte, ohne die Kondensationsreaktion vollständig zu unterdrücken. Samel *et al.* gelang es, die Struktur der PCP-C-Bidomäne aus der Tyrocidin-Synthetase TycC in Röntgenbeugungsexperimenten zu lösen. Die C-Domäne nahm dabei eine Struktur ein (s. 1.1.1.3), in der das zweite, katalytisch wichtige Histidin in Richtung der Bindungsspalte der V-förmigen Faltung hineinragt.⁶⁸ Das erste Histidin

dagegen nahm eine der Substratbindungstasche abgewandten Position ein, wodurch es an der direkten Katalyse nicht beteiligt sein kann, sondern eventuell die Spezifität oder Effizienz beeinflussen kann (Abb. 6.4). Die Situation in SrfAA-C1 ist aufgrund des Verhaltens der Varianten H140A und H139A vermutlich identisch, mit dem zweiten Histidin als katalytisch aktiven Rest in dem sogenannten „Canyon“ für die Substratbindung und -verknüpfung. Mit Hilfe des Web-Tools I-Tasser²²⁷⁻²²⁸ wurde ein Strukturmodell der C-Domäne SrfAA-C1 erstellt. Als Template wurden bei dieser Rechnung durch Röntgenbeugungs- oder NMR-Studien gelöste Strukturen der C-Domänen aus TycC-PCP5-C6, aus SrfAC und VibH verwendet.^{59,68-69} Die vorhergesagten Werte für die Genauigkeit lagen dabei in dem von I-Tasser angegebenen signifikanten Bereich und erlauben eine eingeschränkte Verwendung des Modells. In Überlagerungen mit den Strukturen der C-Domänen aus TycC-PCP5-C6 und SrfAC kann man erkennen, dass die Faltung der Initiations-C-Domäne dieselbe charakteristische V-Form aus der N-terminalen und C-terminalen Subdomäne einnimmt (Abb. 6.4A). Das katalytisch aktive Histidin H140 ragt am Boden des Substratkanals in die putative aktive Tasche hinein, was mit dem gezeigten Verhalten der H140A Variante übereinstimmt. Ebenfalls zu erkennen sind zwei deutlich ausgeprägte Kanäle, die vermutlich für die Bindung und Positionierung der Ppant-gebundenen Substrate auf der Donor- und Akzeptorseite verantwortlich sind.

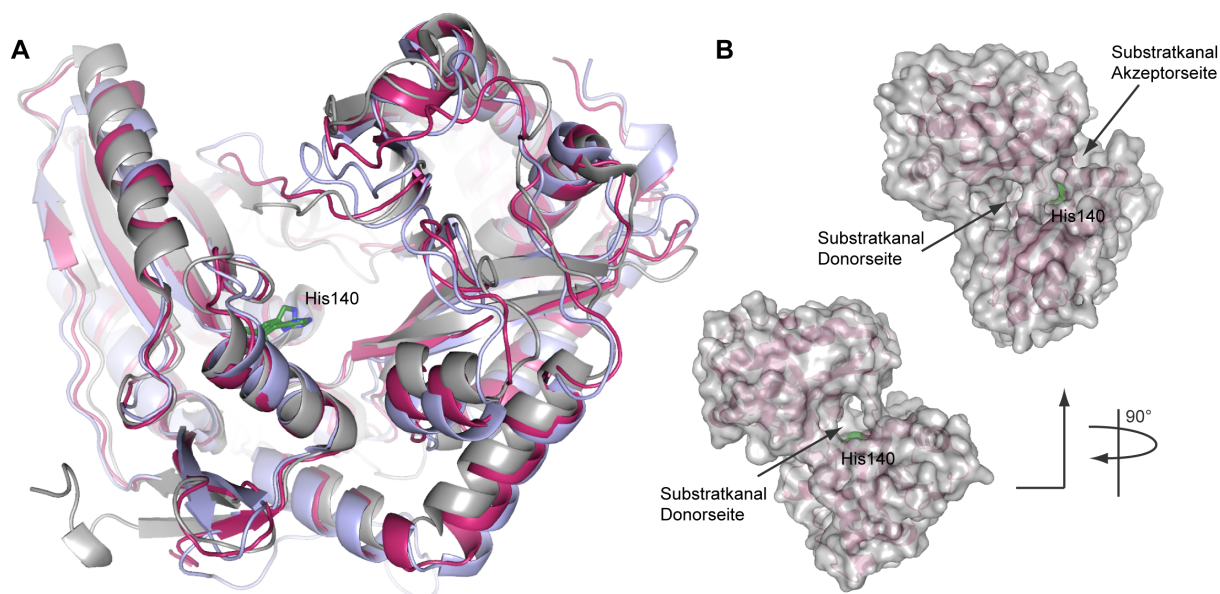


Abb. 6.4: Strukturmodell von SrfAA-C1. A: Superposition des SrfAA-C1-Modells (magenta), TycC-C6 (hellblau, PDB-Code: 2jgpA) und SrfAC-C1 (grau, PDB-Code 2vsqA) in Cartoon-Darstellung. Die RMSD-Werte der C_α-Atome betragen für TycC-C6 1.24 Å und für SrfAC-C1 1.19 Å. B: Oberflächendarstellung des SrfAA-C1-Modells mit Blick auf die Donorseite (unten) und mit Blick auf den Canyon (oben). Das katalytisch aktive Histidin (in SrfAA-C1 H140) ist in den Darstellungen grün hervorgehoben.

Die Ergebnisse der Untersuchung von SrfAA-C1 und den untersuchten Varianten der Histidin-Reste weisen aufgrund der Ähnlichkeit zu früheren Studien anderer C-Domänen auf einen universellen Katalysemechanismus hin (Abb. 6.5), obwohl die Substrate dieser C-Domänen durchaus unterschiedlich sind. SrfAA-C1 bindet auf der Donorseite eine CoA-aktivierte Fettsäure im Gegensatz zu C-Domänen aus Elongationsmodulen, die Peptidyl-S-PCP-Substrate erkennen. Die Aktivierung als Thioester folgt jedoch dem gleichen Prinzip, da die Fettsäure ebenfalls an den 4'-Phosphopantetheinylrest von Coenzym A gebunden ist, der auch in PCP-Domänen als der Träger der Substrate fungiert. Die Bindungstasche auf der Donorseite von SrfAA-C1 könnte also trotz der Erkennung einer Fettsäure Ähnlichkeiten zu denen von Elongations-C-Domänen besitzen. Nach Mutationsstudien der Elongations-C-Domäne TycB-C1 schlugen Bergendahl *et al.* eine Säure-Base-Katalyse für die Peptidbindungsknüpfung vor, in der das katalytisch wichtige zweite Histidin des Motivs HHxxxDG den Angriff der Aminogruppe auf den Peptidyl-S-PCP-Thioester durch Deprotonierung des Amins begünstigt.⁵⁷ Samel *et al.* gingen dagegen aufgrund der Struktur der PCP-C-Bidomäne von einer elektrostatischen Stabilisierung des tetraedrischen Oxyanion-Übergangszustandes durch das Histidin aus, da Berechnungen ergaben, dass das Histidin in der Enzymumgebung einen pK_s-Wert von 11.8 besitzt und damit unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen sollte.⁶⁸ Zudem nahm in der Struktur ein zu dem tetraedrischen Übergangszustand analoges Sulfation die Position ein, in der sich vermutlich während der Elongation die Thioestergruppe des Donorpeptidyl-S-PCP-Rests befindet. Wendet man diese Erkenntnisse auf die Amidbindungsknüpfung in der Lipoinitiationsreaktion von Surfactin an, kann man auch für SrfAA-C1 einen Vorschlag für den Katalysemechanismus machen, der in Abb. 6.5 gezeigt ist. Durch Vorkoordination werden die Substrate in räumliche Nähe gebracht und der nukleophile Angriff der Aminogruppe erleichtert (Abb. 6.5A). Das dadurch entstehende tetraedrische Oxyanion wird durch das protonierte zweite Histidin des HHxxxDG Motivs stabilisiert (Abb. 6.5B). Eine anschließende Abspaltung von Coenzym A führt zu der Freisetzung des *N*-acylierten Produkts von dem katalytischen Zentrum (Abb. 6.5C). Das Modell von SrfAA-C1 zeigt große Ähnlichkeiten in der Faltung und der aktiven Tasche zu den anderen betrachteten C-Domänen und unterstützt damit ebenfalls neben den Mutationsstudien die These eines universellen Katalysemechanismus der C-Domänen (Abb. 6.4).

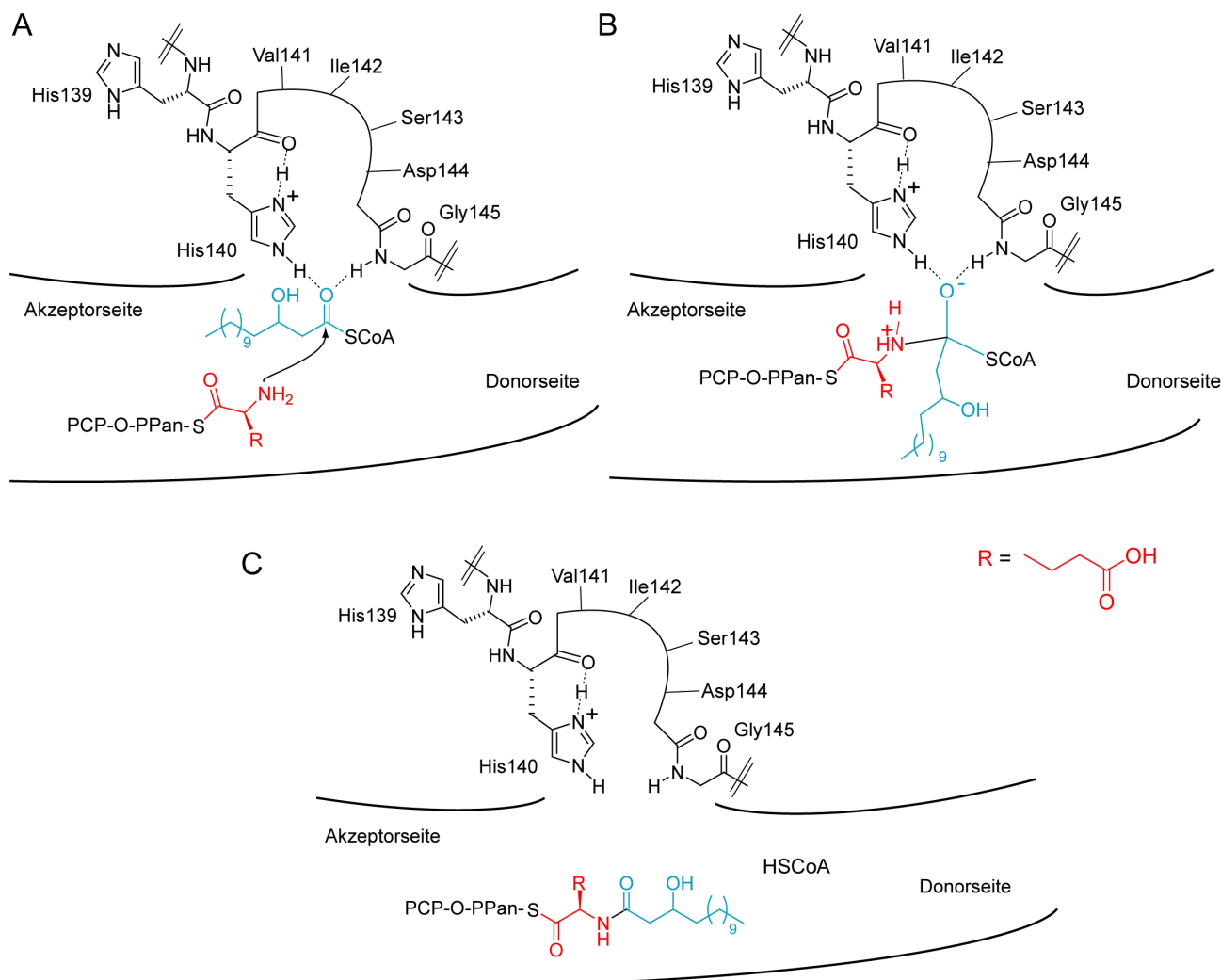


Abb. 6.5: Vorschlag für den Katalysemechanismus der Amidbindungsknüpfung von SrfAA-C1. A: Koordination der Substrate auf Akzeptor- und Donorseite im Substratkanal. B: Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustands durch das katalytisch notwendige Histidin H140. C: Produktbildung und -freisetzung über die Akzeptorseite.

6.1.3 Vorschlag für den Lipoinitiationsmechanismus in der Biosynthese von Surfactin

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Lipoinitiation in der Surfactin-Biosynthese charakterisiert werden (Abb. 6.6). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Fettsäure als Thioester mit Coenzym A *in trans* durch Enzyme des Primärmetabolismus oder anderen Synthesewegen der Zelle übernommen wird. Die Beteiligung der vier FACL LcfA, YhfL, YhfT und YngI konnte durch *in vivo* und *in vitro* Studien bewiesen werden, auch wenn andere Aktivierungsmechanismen noch unbekannt bleiben, deren Involvierung an der Surfactinbiosynthese durch eine Restproduktion von 16% der Wildtypmenge in der Vierfachmutante $\Delta lcfA \Delta yhfL \Delta yhfT \Delta yngI$ deutlich werden. Zweifelsfrei konnte die Initiations-C-Domäne als Acyltransferase für die Übertragung der Fettsäure

auf die α -Aminogruppe von Glutaminsäure-*S*-PCP identifiziert werden. SrfAA-C1 zeigte in dieser Reaktion sowohl an der Donor- als auch an der Akzeptorstelle eine ausgeprägte Substratspezifität.

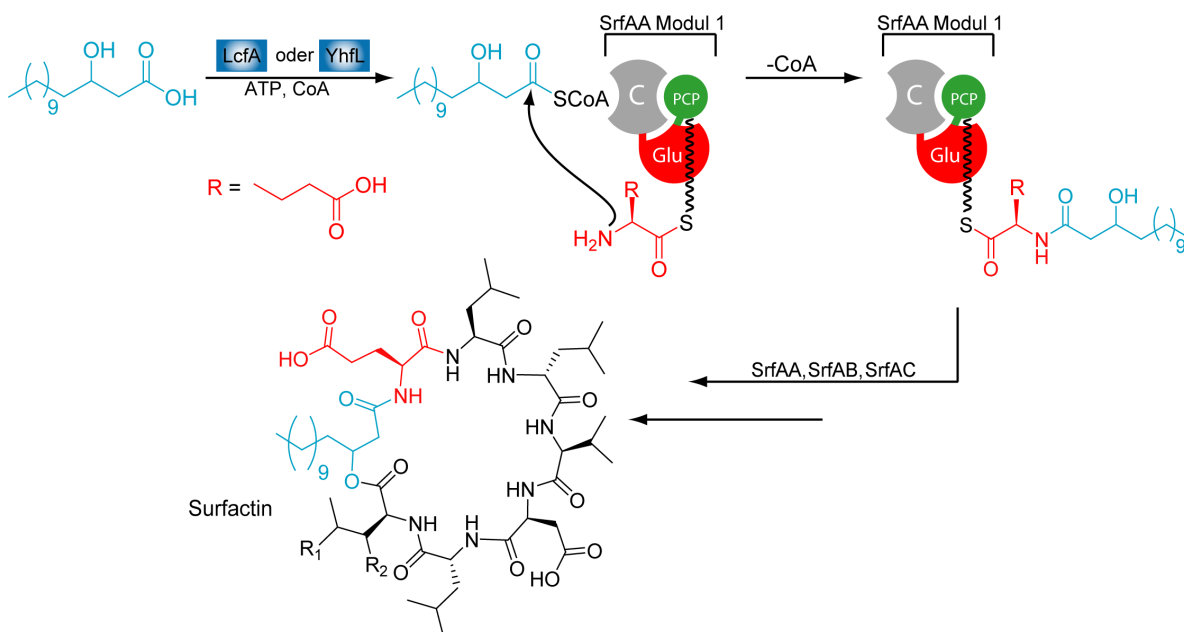


Abb. 6.6: Lipoinitiation der Surfactin-Biosynthese. 3-Hydroxymyristinsäure wird durch eine FACL als Thioester mit Coenzym A aktiviert und anschließend von der C-Domäne des Initiationsmoduls von SrfAA auf Glutaminsäure übertragen, wodurch die weiteren Peptidelongationsschritte auf den NRPS SrfAA, SrfAB und SrfAC stattfinden können. Durch Zyklisierung mittels TE-Domänen-Katalyse in SrfAC wird das Lipoheptapeptid Surfactin schließlich freigesetzt.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die Entwicklung neuer Lipopeptide für die Anwendung unter anderem als Wirkstoffe oder Biotenside. Die Toleranz von SrfAA-C1 gegenüber der PCP-Domäne macht einen Einbau in fremde NRPS prinzipiell möglich, jedoch müssen die Substrate der NRPS zu der Spezifität von SrfAA-C1 passen, außerdem müssen Selektivitäten *downstream* liegender Domänen beachtet werden, deren Akzeptanz *N*-acylierter Substrate durch intensive Forschungsarbeit erreicht werden müsste. Vor allem die Veränderung der Spezifität von SrfAA-C1 stellt einen möglichen Ansatz zur Entwicklung neuer Lipopeptide mit veränderten Fettsäureresten dar.

6.2 Aufklärung der Lipoinitiationsreaktion in der CDA-Biosynthese

CDA aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) gehört zu der Klasse der sauren Lipodepsipeptide, zu dessen Vertretern auch das in den USA zugelassene Antibiotikum Daptomycin zählt. Wie für die

NRPS von Lipopeptiden typisch, weist auch die NRPS Cda-PS1 des CDA-Biosynthesecusters eine N-terminale C-Domäne auf, welche in dieser Arbeit als Initiations-C-Domäne identifiziert wurde (s. 1.2.2). Anders als im biosynthetischen Gencluster von Surfactin, sind im Gencluster der CDA-Biosynthese einige Gene vorhanden, die mit der Fettsäure-Synthese und Aktivierung in Verbindung gebracht werden (Abb. 1.17).¹³⁶ Da innerhalb dieser Gene auch ein Acyl-Carrier-Protein kodiert ist, liegt es nahe, dass der Transfer des Fettsäurerests von diesem ACP auf die N-terminale Aminosäure Serin in der CDA-Biosynthese stattfindet. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur Untersuchung dieser Reaktion werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

6.2.1 Herstellung der Substrate Aminoacyl-S-PCP und Acyl-S-ACP

Um die Reaktion der Initiations-C-Domäne Cda-C1 untersuchen zu können, wurden die Substrate Carrier-Protein-gebunden benötigt. Zudem enthält die Fettsäure von CDA eine 2,3-Epoxygruppe, die durch die Monooxygenasen HxcO oder HcmO eingeführt wird.¹³⁹ Eine Reaktion, in denen die Beladung der Carrier-Proteine und die Epoxidierung des Fettsäurerests *in situ* erfolgt, erschwert die Analyse mittels HPLC-MS aufgrund einer hohen Komplexität durch die Anwesenheit zahlreicher Proteine (Cda-C1, *apo*-, *holo*-, Acyl- und Aminoacyl-CP, Sfp, HxcO), Substrate (Serinoyl-CoA, Hexanoyl- oder Hexenoyl-CoA), Kofaktoren (FAD, NADH und MgCl₂) und Pufferkomponenten. Um eindeutige Rückschlüsse auf die Katalyse von Cda-C1 zu erlauben, wurden die Carrier-Proteine in einem präparativen Reaktionsansatz beladen und mittels Gelfiltration gereinigt, um Sfp, HxcO, Kofaktoren sowie überschüssige Substrate wie Serinoyl- oder Hexanoyl-CoA zu entfernen (Abb. 6.7).

Die so gereinigten Carrier-Proteine wurden massenspektrometrisch untersucht, um die erfolgreiche Beladung und Reinheit nachzuweisen (s. 5.2.2).

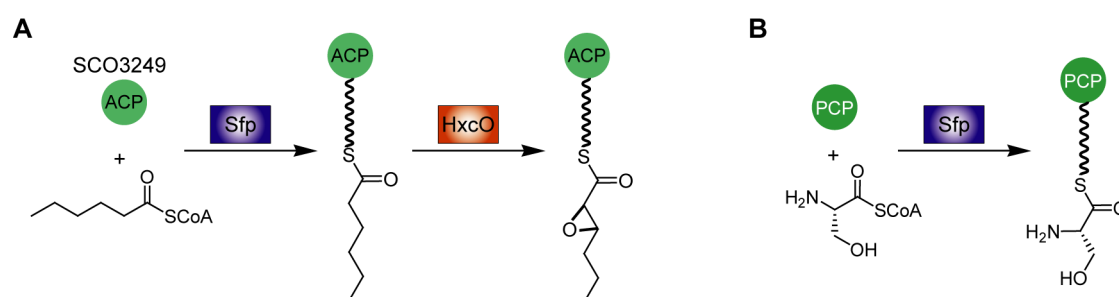


Abb. 6.7: Darstellung der Substrate für die Lipoinitiation von CDA. Die chemisch synthetisierten CoA-Derivate Hexanoyl-CoA (A) und Serinoyl-CoA (B) wurden durch Inkubation mit Sfp auf die Carrier-Proteine übertragen. Die 2,3-Epoxygruppe wurde durch die Monooxygenase HxcO eingeführt (A).

Sowohl Serinoyl-*S*-PCP als auch 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP konnten präparativ hergestellt und rein erhalten werden. Neben einem Signal der *holo*-Form des Carrier-Proteins konnte nur das jeweilige CP-gebundene Substrat beobachtet werden, die Enzyme Sfp und HxcO konnten über die Gelfiltration erfolgreich abgetrennt werden (s. Abb. 5.14 und 5.15). Die beobachtete *holo*-Form kann sowohl durch Übertragung von freiem CoA gebildet werden, das durch Hydrolyse des chemisch labilen Syntheseprodukts Serinoyl- oder Hexanoyl-CoA entstehen kann, als auch durch Hydrolyse des Thioesters nach der Übertragung auf die CP-Domäne. Die präparative Darstellung der beladenen Carrier-Proteine erlaubte eine kurzfristige Lagerung der Substrate und den Einsatz von sauberen Substraten für die Lipoinitiationsreaktion mit Cda-C1.

6.2.2 Lipoinitiationsreaktion durch Katalyse von Cda-C1

Zur Untersuchung der Fettsäureübertragung in der Biosynthese von CDA, wurde die Initiations-C-Domäne von Cda-PS1 durch molekularbiologische Techniken artifiziell von den folgenden Domänen getrennt (Abb. 6.8) und als alleinstehendes Protein produziert und gereinigt (s. 5.2.1).

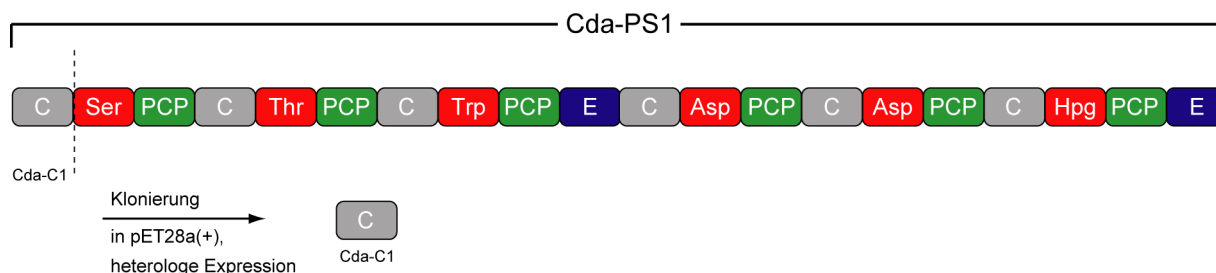


Abb. 6.8: Schematische Darstellung der NRPS Cda-PS1 und Andeutung der gewählten Grenze zur Darstellung des artifiziellen Proteins Cda-C1. Hpg: Hydroxyphenylglycin.

In vorigen Arbeiten wurde zunächst das Initiationsmodul Cda-M1 (C-A-PCP) kloniert und heterolog exprimiert, um die Lipoinitiation zu untersuchen.²¹⁶ Dabei konnte das Modul jedoch nicht als lösliches Protein erhalten werden, wodurch keine *in vitro* Studien des Fettsäuretransfers möglich waren. In dieser Arbeit wurde daher die bei Surfactin etablierte Strategie zur Untersuchung der Lipoinitiation angewendet und die C-Domäne als alleinstehendes Protein produziert. Cda-C1 konnte als lösliches Protein in Ausbeuten von 2.6 mg pro Liter Zellkultur erhalten werden (s. 5.2.1), wodurch eine biochemische Charakterisierung ermöglicht wurde.

Die Analyse der Reaktionen mit Cda-C1 zeigte, dass 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP direkt als Substrat für den Fettsäuretransfer auf die α -Aminogruppe von Serinoyl-*S*-PCP dient. Diese

Kondensationsreaktion konnte nur in Anwesenheit der C-Domäne Cda-C1 beobachtet werden (s. 5.2.3). Das *N*-acylierte Produkt wurde nicht gebildet, wenn die C-Domäne exkludiert oder die inaktivierte Variante H157A in der Reaktion verwendet wurde (s. 5.2.4). In der Variante H157A ist der zweite Histidinrest des universellen katalytischen Motivs der C-Domäne HHxxxDG durch einen Alaninrest substituiert. Diese Mutation zeigte bereits in früheren Studien verschiedener C-Domänen eine Notwendigkeit dieses Histidinrests für die Katalyse (s. 6.1.2).^{58,76,215} Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen zweifelsfrei, dass die Initiations-C-Domäne von Cda-PS1 als Acyltransferase für den Einbau der Fettsäure in das Lipopeptid CDA verantwortlich ist.

Ein mit Hilfe von I-Tasser²²⁷⁻²²⁸ erstelltes Modell der Struktur von Cda-C1 zeigt in Analogie zu dem Modell von SrfAA-C1 hohe Ähnlichkeiten in der Faltung zu bereits bekannten C-Domänen (Abb. 6.9A). Passend zu den Mutationsstudien ist auch hier deutlich zu erkennen, dass der Histidinrest H157 in den Canyon der Substratbindung hineinragt und somit zugänglich für die bereits in 6.1.2 angesprochenen Katalysemechanismen ist. Auch in diesem Modell sind die Kanäle für die Substrat-Ppant-Reste deutlich zu erkennen (Abb. 6.9B). Die Mutationsstudien und das Strukturmodell von Cda-C1 deuten wie die Ergebnisse der Studie von SrfAA-C1 auf einen ähnlichen, für C-Domänen allgemein gültigen Katalysemechanismus (Abb. 6.5) hin.

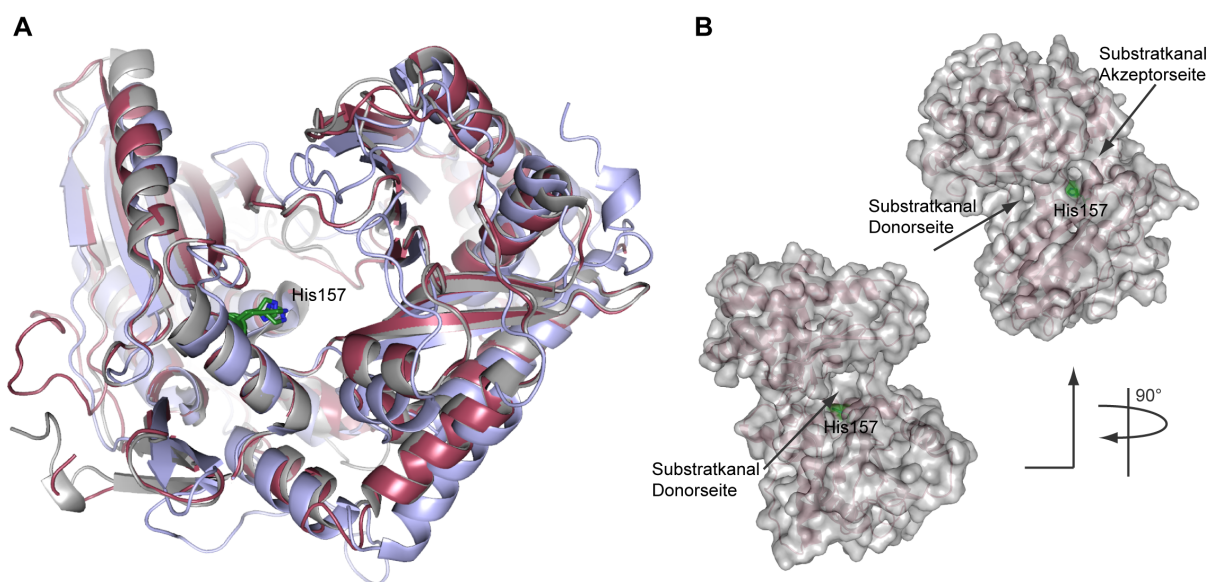


Abb. 6.9: Strukturmodell von Cda-C1. A: Superposition des Cda-C1-Modells (dunkelrot), TycC-C6 (hellblau, PDB-Code: 2jgpA) und SrfAC-C1 (grau, PDB-Code 2vsqA) in Cartoon-Darstellung. Die RMSD-Werte der C_{α} -Atome betragen für TycC-C6 2.27 Å und für SrfAC-C1 0.37 Å. B: Oberflächendarstellung des Cda-C1-Modells mit Blick auf die Donorseite (unten) und mit Blick auf den Canyon (oben). Das katalytisch aktive Histidin (in Cda-C1 H157) ist in den Darstellungen grün hervorgehoben.

Die Untersuchung der Reaktion mit alleinstehenden Domänen ermöglichte eine einfache Substitution der verschiedenen Substrate und Carrier-Proteine, um die Spezifität von Cda-C1 zu untersuchen (Abb. 6.10).

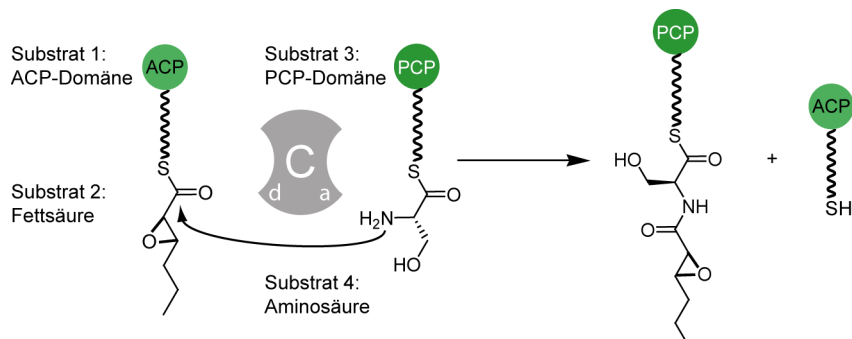


Abb. 6.10: Schematische Darstellung der Lipoinitiationsreaktion in CDA durch Katalyse von Cda-C1 und die vier Substrate, die zur Bestimmung der Spezifität von Cda-C1 substituiert wurden.

Die C-Domäne Cda-C1 zeigte auf der Akzeptorseite eine hohe Spezifität für die PCP-gebundene Aminosäure (Substrat 4, Abb. 6.10), nur die chemisch sehr ähnliche Aminosäure Threonin wurde durch Cda-C1 N-acyliert (s. 5.2.3 und Tabelle 5.4). Die PCP-Domäne selbst (Substrat 3, Abb. 6.10) war für die Erkennung nicht relevant, weder die mit Serin beladene PCP-Domäne SrfAA-PCP1 noch DptA-PCP1 störten die Produktbildung (s. 5.2.3 und Tabelle 5.4). Dieses Verhalten ist analog zu der Spezifität der Initiations-C-Domäne SrfAA-C1 und lässt die gleichen Rückschlüsse zu (s. 6.1.2).

Auf der Donorseite konnte eine Spezifität für die daran gebundene Fettsäure beobachtet werden (Substrat 2, Abb. 6.10). Der Fettsäurerest in CDA ist invariant, was eher ungewöhnlich für Lipopeptide ist, die häufig eine gewisse Varianz in der Länge oder Verzweigung der eingebauten Fettsäure zeigen (s. 1.2).¹⁶⁹ Die hier beobachtete ausgeprägte Spezifität von Cda-C1 für den Fettsäurerest könnte dieses Phänomen erklären. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass diese Ergebnisse aus *in vitro* Studien mit heterolog produzierten Proteinen mit artifiziellen N- und C-Termini stammen und daher weitere Studien benötigt werden, um diese Erkenntnisse auf die Situation *in vivo* übertragen zu können. Für die Biosynthese-Maschinerie von CDA gibt es bereits einige *in vivo* Studien in *Streptomyces coelicolor*, die eine gewisse Varianz des Fettsäureanteils in dem Lipopeptid CDA gezeigt haben und daher *in vivo* auf eine gewisse Toleranz der NRPS und damit auch von Cda-C1 hinweisen.^{174,229} Powell *et al.* zeigten, dass die Deletion von *hxcO* zur Produktion einer CDA-Variante führte, die keine 2,3-Epoxygruppe aufweist.¹⁷⁴ Studien von Lewis *et al.* zeigten, dass durch Modifikation der Spezifität der β -Ketoacyl-ACP-Synthase FabF3 (s. 1.2.2)

in *S. coelicolor* auch C4-Fettsäuren in CDA eingebaut werden können.²²⁹ Die Mengen dieser CDA-Varianten waren jedoch in beiden Fällen deutlich niedriger als die Produktion von CDA im Wildtyp. Die Akkumulation von Hexanoyl- oder Butyryl-S-ACP in den Mutantenstämmen könnte das Gleichgewicht der Lipoinitiationsreaktion in Richtung des Produkts drängen und somit zu einer geringen Produktionsrate der CDA-Varianten führen, die in den hier durchgeführten *in vitro* Studien nicht beobachtet werden konnte.

Die Stereokonfiguration der Epoxygruppe hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die *N*-Acylierung durch Cda-C1. Da nur die relative und nicht die absolute Konfiguration der Epoxygruppe in CDA trotz extensiver NMR-Studien aufgeklärt werden konnte, ist nicht bekannt, welche der beiden Enantiomere der 2,3(*trans*)-Epoxyhexansäure in CDA vorkommt.¹³⁶ Die Untersuchung von Cda-C1 ergab keine Beschränkung bezüglich der absoluten Stereokonfiguration der Epoxygruppe und lässt daher auch keine Rückschlüsse auf das in CDA eingebaute Enantiomer zu. Eine Deletionsmutante von *hcmO* zeigte keine Produktion von CDA-verwandten Lipopeptiden, was nahe legt, dass *hcmO* *in vivo* notwendig für die Produktion von CDA ist. Die Epoxidierung durch HcmO verläuft stereospezifisch zum (2*S*,3*R*)-konfigurierten Produkt, wie Kopp *et al.* zeigen konnten.^{139,174} Weitere Studien sind jedoch nötig, um eindeutige Aussagen über die Rolle von HxcO und HcmO in der Produktion von CDA in *Streptomyces coelicolor* und die vorkommende Stereokonformation der Epoxygruppe machen zu können.

Die ACP-Domäne wurde in der Lipoinitiationsreaktion durch zwei verschiedene ACP-Domänen ersetzt (Substrat 1, Abb. 6.10): DptF aus dem biosynthetischen Gencluster von Daptomycin in *Streptomyces roseosporus* und AcpK aus *Bacillus subtilis*, das in der Synthese von Polyketiden involviert ist.^{18,140,219} Die Beladung dieser ACP mit Hexansäure und die Epoxidierung durch HxcO oder HcmO konnte zwar erreicht werden (s. Tabelle 5.3), jedoch fand keine Übertragung der Fettsäure auf Ser-S-PCP in Anwesenheit von Cda-C1 statt (Tabelle 5.4). Dieses Resultat deutet auf eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen der C- und der ACP-Domäne hin. In mehreren Studien konnten einige Reste im Bereich der Helix II, des Loops II und der Helix III verschiedener CP identifiziert werden, die an spezifischen Domänen-Interaktionen beteiligt sind.²³⁰⁻

²³¹ In NRPS-Systemen wurden einige Faltungs- und Sequenzmotive als sogenannte „Com-Domänen“ definiert (*communication mediating domains*), durch die die Erkennung zweier aufeinanderfolgender NRPS gewährleistet wird.²³² Ob ähnliche Erkennungsmechanismen in der Interaktion während der Lipoinitiation zwischen Cda-C1 und der ACP-Domäne vorliegen, muss durch weiterführende Studien geklärt werden.

Das hier etablierte System mit der alleinstehenden C-Domäne Cda-C1 und den gereinigten, beladenen Carrier-Proteinen erlaubt die Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion unabhängig von anderen Reaktionen wie beispielsweise der CP-Beladung oder der Aktivierung der Aminosäure durch A-Domänen-Katalyse. Um die Kondensation des 2,3-Epoxyhexanoylrests und Serin auch quantitativ untersuchen zu können, muss die Menge des Produkts quantifiziert werden können. Dafür muss die Hydrolyse des Substrat-PCP-Thioesters vermieden werden, was durch Substitution des Schwefels gegen Stickstoff realisiert werden kann.²³³ Die Verwendung von Serinoyl-Amino-CoA bei der Beladung der PCP-Domäne führt zu einer Amidbindung zwischen Substrat und PCP-Domäne. Diese Substitution würde die quantitative Untersuchung der Lipoinitiationsreaktion ermöglichen, da das Produkt aufgrund der wesentlich stabileren Amidbindung anstelle einer Thioesterbindung keiner Hydrolyse unterläge. Allerdings konnte für Serinoyl-*N*-PCP keine *N*-Acylierung durch Cda-C1 beobachtet werden, weswegen keine verlässlichen kinetischen Studien dieser Reaktion möglich waren (Tabelle 5.4).

6.2.3 Vorschlag für den Lipoinitiationsmechanismus in der Biosynthese von CDA

Aus den hier gewonnenen Erkenntnissen der *in vitro* Studien von Cda-C1 wurden neue Einblicke in die Lipoinitiationsreaktion der CDA-Biosynthese erlangt. Der Acyltransfer findet eindeutig durch Katalyse der Initiations-C-Domäne der NRPS Cda-PS1 statt. Anders als in der Lipoinitiation von Surfactin liegt die Fettsäure nicht CoA-aktiviert, sondern ACP-gebunden vor. Die vorausgehende Synthese der ungewöhnlichen 2,3-Epoxyhexansäure findet ebenfalls ACP-gebunden statt, nachdem Hexanoyl-ACP vermutlich durch die β -Ketoacyl-ACP-Synthasen(KAS) -II und -III FabF3 und FabH4 und anderen Enzymen aus dem Primärmetabolismus zur Fettsäuresynthese dargestellt wurde (Abb. 6.11).¹⁷⁴ Anschließend wird die Epoxygruppe durch HxcO und HcmO eingeführt und das resultierende 2,3-Epoxyhexanoyl-*S*-ACP dient als Substrat für die Übertragung des Fettsäurerests auf an Cda-PS1 gebundenes Serin durch die Katalyse der Initiations-C-Domäne Cda-C1. Durch die *N*-Acylierung des Serinrests werden die weiteren Elongationsschritte durch Cda-PS1-3 initiiert und das assemblierte Lipopeptid wird schließlich durch Zyklisierung in der TE-Domäne von Cda-PS3 freigesetzt.

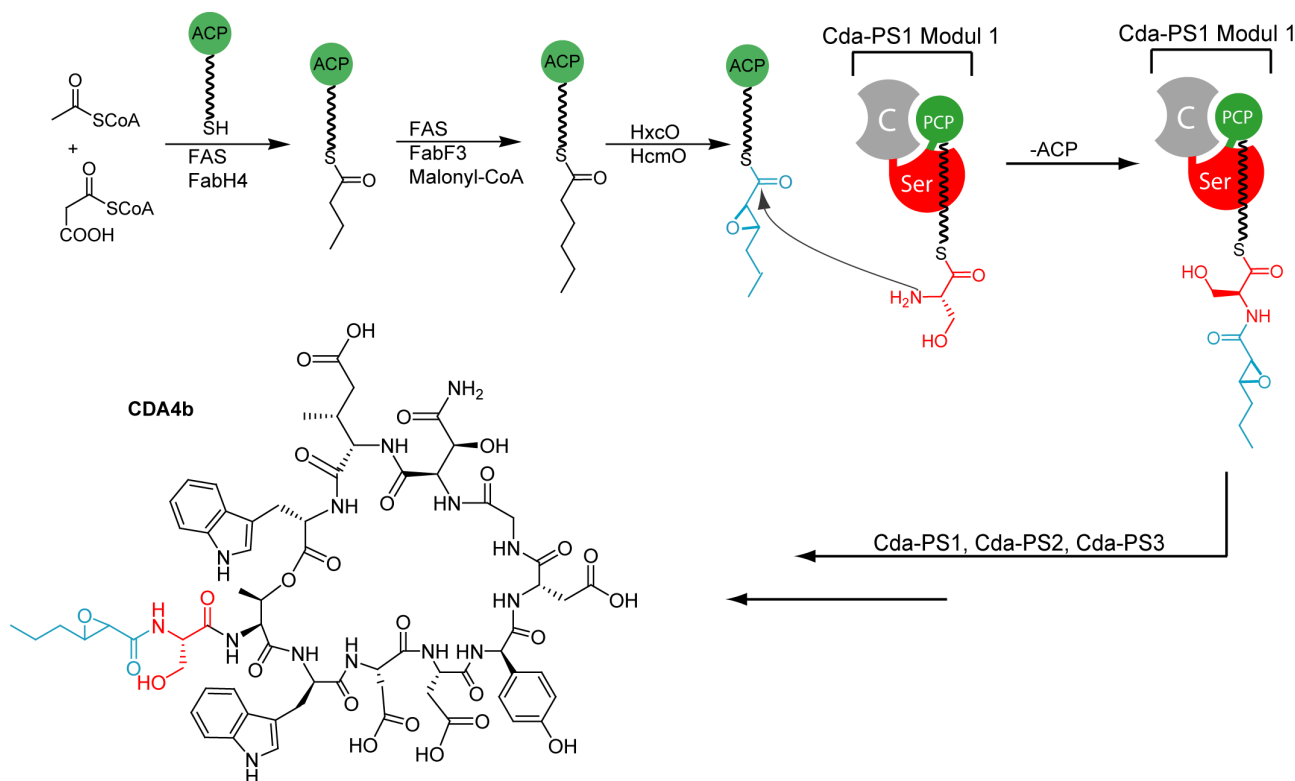


Abb. 6.11: Vorschlag für die Lipoinitiation der CDA-Biosynthese. Die β -Ketoacyl-ACP-Synthase (KAS) III FabH4, die KAS II FabF3 und Fettsäuresynthase-Enzyme des Primärmetabolismus (FAS) assemblieren Hexanoyl-ACP, das durch die Katalyse von HxcO und HcmO epoxidiert wird. Anschließend findet die Übertragung des Fettsäureanteils durch die Initiations-C-Domäne von Cda-PS1 auf Serin statt, wodurch die Elongation des Peptids auf Cda-PS1-3 gestartet wird. Durch Zyklisierung wird das Lipopeptid CDA schließlich freigesetzt.

6.3 Unterschiedliche Strategien der Lipoinitiation in der Naturstoffsynthese

Mikrobielle Lipopeptide weisen eine Vielfalt von Bioaktivitäten auf, die von biotechnologischem und pharmazeutischem Interesse sind (s. 1.2.2), wobei die Eigenschaften und das Verhalten maßgeblich von dem Fettsäureanteil beeinflusst werden.^{74,170-171,221} Die Anknüpfung der Fettsäure in das Peptidrückgrat ist daher ein grundlegender Schritt in der Biosynthese dieser Naturstoffe, der auch für die Entwicklung neuer Lipopeptide eine wichtige Rolle spielt. In dieser Arbeit wurde der Fettsäureeinbau in der Biosynthese der Lipopeptide Surfactin und CDA untersucht. Zu Beginn dieser Promotionsarbeit war bereits ein Mechanismus für den Einbau eines Fettsäurerests in ein NRPS/PKS-Hybrid bekannt. Hierbei handelt es sich um die Übertragung eines β -Aminoacylrests auf Asparagin in der Biosynthese von Mycosubtilin (Abb. 6.12).²³⁴ Hansen *et al.* zeigten, dass Dekansäure zunächst durch eine Acyl-Ligase (AL) in MycA auf die erste ACP-Domäne geladen, anschließend durch eine Ketosynthase (KS) elongiert und durch eine Aminotransferase (AMT)

aminiert wird. Die Übertragung dieses Acylrests auf die Aminosäure Asparagin erfolgt durch eine Kondensation zwischen den PKS- bzw. NRPS-gebundenen Substraten (Abb. 6.12B).

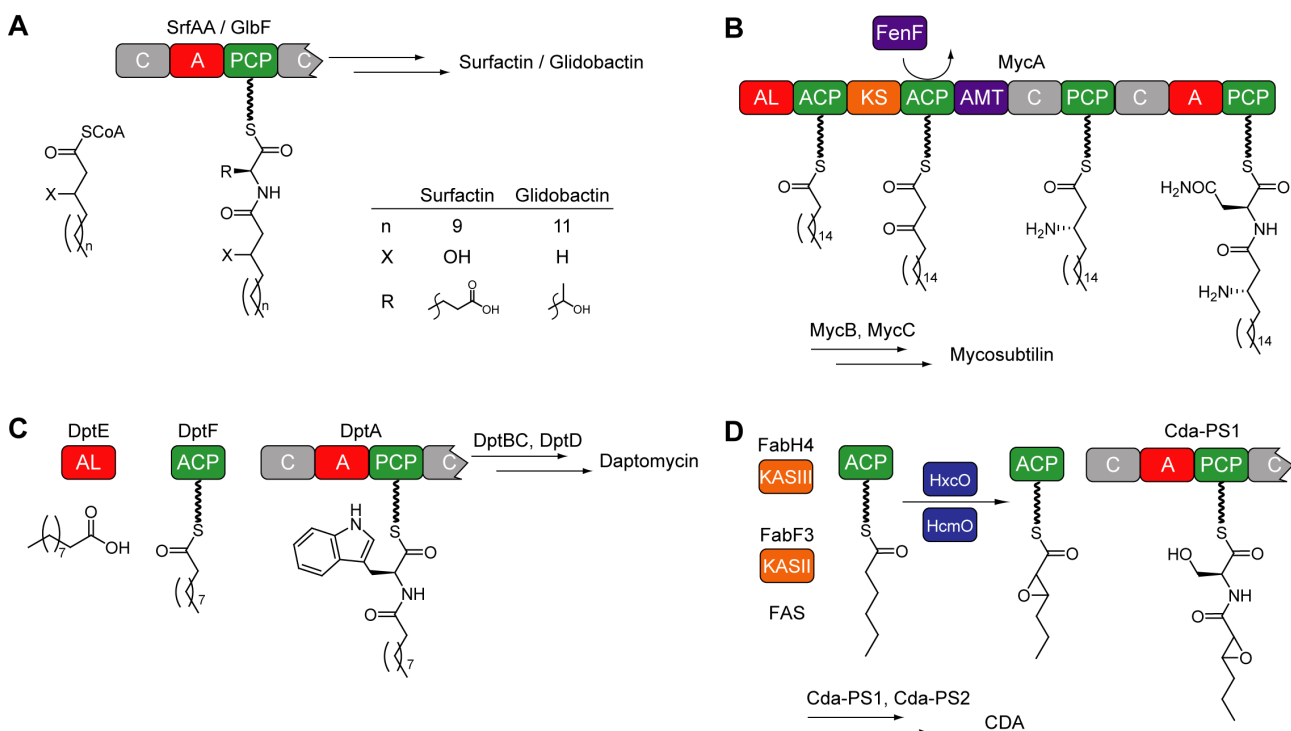


Abb. 6.12: Bekannte Lipoinitiationsmechanismen in der Biosynthese von A: Surfactin und Glidobactin; B: Mycosubtilin; C: Daptomycin und D: CDA. Abkürzungen: Acyl-Ligase (AL), Aminotransferase (AMT), Ketoacyl-ACP-Synthase (KAS), Enzyme der Fettsäuresynthese (FAS).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere Mechanismen für den Einbau der Fettsäure in rein durch NRPS synthetisierte Lipopeptide aufgeklärt. Im Fall der Surfactin-Biosynthese ist die Lipoinitiation relativ simpel und bedarf neben den drei NRPS SrfAA-C keiner zusätzlichen, nur für die Surfactin-Synthese benötigten Enzyme. Die Initiations-C-Domäne der NRPS SrfAA verwendet aus den in der Zelle vorhandenen Fettsäure-CoA-Thioestern die für die Surfactin-Produktion benötigten Fettsäurereste und acyliert die Aminogruppe der *downstream* gelegenen Serinoyl-S-PCP (Abb. 6.12A). Hierdurch wird die Elongation der Peptidkette gestartet und Surfactin wird assembliert und freigesetzt. Ein weiteres Beispiel für diesen Weg der Lipoinitiation wurde während dieser Promotionsarbeit von Imker *et al.* für die Biosynthese von Glidobactin veröffentlicht.⁴¹ Die in diesem Lipopeptid aus *Burkholderia* K481-B101 vorkommenden Diene, überwiegend 2(E),4(E)-Dodekadiensäure, werden ebenfalls als CoA-Thioester aktiviert und durch die Initiations-C-Domäne der NRPS GlbF auf das Peptidrückgrat übertragen.

In der CDA-Biosynthese wird die Fettsäuresynthese, -modifikation und der -einbau durch mehrere

Enzyme gewährleistet, die zum Teil im CDA-Gencluster kodiert sind und damit vermutlich nur für die Produktion dieses Sekundärmetaboliten relevant sind (Abb. 1.17). Durch Ketoacyl-ACP-Synthasen (KAS) des Typs II und III und durch Enzyme der Fettsäuresynthese im Primärmetabolismus wird zunächst 2,3-Epoxyhexansäure an der ebenfalls im CDA-Gencluster kodierten ACP-Domäne synthetisiert.¹⁷⁴ Nach Einführung der Epoxygruppe durch HxcO und HcmO^{139,174} wird der Fettsäurerest des Acyl-S-ACPs durch Katalyse der Initiations-C-Domäne auf die Aminosäure Serin übertragen, wodurch wiederum die Peptidsynthese initiiert wird (Abb. 6.12D). Dieser Mechanismus ähnelt dem postulierten Weg für den Fettsäuretransfer in der Daptomycin-Biosynthese. Hier ist ebenfalls ein ACP im Biosynthese-Gencluster kodiert (DptF) neben einer Acyl-Ligase (DptE), für die gezeigt werden konnte, dass sie Dekansäure unter Verbrauch von ATP auf das ACP DptF überträgt (Abb. 6.12C).¹⁴⁰ Die Präsenz einer Initiations-C-Domäne in der NRPS DptA spricht dafür, dass der Dekanoylrest analog zur Lipoinitiation von Surfactin und CDA durch C-Domänen-Katalyse auf die N-terminale Aminosäure Tryptophan übertragen wird.

Die Vielfalt der durch C-Domänen katalysierten Reaktionen wird durch die in dieser Arbeit angefertigten Untersuchungen um die Klasse der Initiations-C-Domänen erweitert, die als Acyltransferasen die Kondensation eines Acylrests mit der α -Aminogruppe einer Aminosäure unter Ausbildung einer Amidbindung katalysieren. Neben der essentiellen Funktion für die Peptidbindungsknüpfung sind auch andere C-Domänen-katalysierte Reaktionen bekannt, wie z.B. die Freisetzung des Peptids durch Zyklisierung anstelle einer TE-Domäne, wie kürzlich von Gao *et al.* gezeigt werden konnte⁷⁸, die Formation eines Esters in der Synthese des Chromoprotein Antibiotikum C-1027⁷³, oder eine Epimerisierung, die mit der Elongationsreaktion einhergeht, wie für sogenannte C/E-Dual-Domänen von Balibar *et al.* gezeigt wurde.¹¹⁴ Diese Beispiele verdeutlichen die Bedeutung der C-Domänen für die Vielfalt der durch NRPS synthetisierten Naturstoffe. Zur Entwicklung neuer Peptide mit optimierten Eigenschaften für biotechnologische oder pharmazeutische Anwendungen ist die detaillierte Charakterisierung einschließlich der Kenntnis der Spezifitäten dieser Domänenklasse unbedingt notwendig. Die Erkenntnisse in dieser Arbeit liefern eine wichtige Grundlage für weiterführende Untersuchungen und der Entwicklung neuer Lipopeptide durch die Charakterisierung zweier Initiations-C-Domänen aus verschiedenen NRPS-Systemen, welche sich vermutlich auch auf andere bekannte NRPS-Systeme, die eine Initiations-C-Domäne enthalten, übertragen lassen.

6.4 Untersuchung der artifiziell singulären Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2

Die Strategie, einzelne Domänen einer NRPS für die Untersuchung der katalysierten Reaktion zu verwenden, führte im Falle der in 6.1 und 6.2 diskutierten Ergebnisse zu einer Aufklärung der Reaktion, zur Identifizierung der beteiligten Substrate und zur Bestimmung der Substratspezifität zweier C-Domänen. Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine weitere Domäne angewendet, die Zyklisierungs-Domäne der NRPS BacA, die an der Synthese des Dodekapeptids Bacitracin aus *Bacillus licheniformis* beteiligt ist.¹¹⁷ Bacitracin A enthält einen Thiazolinring, der aus der zweiten Aminosäure des Peptidrückgrats Cystein mit der N-terminalen Aminosäure Isoleucin gebildet wird.²³⁵ Die Elongation von Isoleucin und die Bildung des Thiazolinrings wird durch die Zyklisierungsdomäne im zweiten Modul der NRPS BacA katalysiert.¹¹⁹ Diese Reaktion wurde im Modulverband bereits von Duerfahrt *et al.* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Elongation und die Zyklisierung zwei voneinander unabhängige Reaktionen sind und es konnten zwei Reste identifiziert werden (N900 und S984), die für die Heterozyklisierung, aber nicht für die Peptidbindungsknüpfung notwendig sind. Zur näheren Untersuchung wurde diese Zyklisierungs-Domäne im Rahmen dieser Arbeit als alleinstehendes Protein rekombinant produziert, sowie die *upstream* gelegene PCP-Domäne BacA-PCP1 und die *downstream* folgenden Domänen BacA-APCP2 (Abb. 6.13, s. 5.3.1).

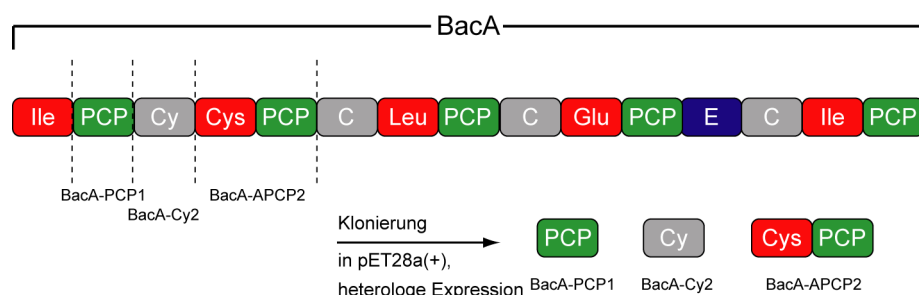


Abb. 6.13: Schematische Darstellung der NRPS BacA und Andeutung der gewählten Grenzen zur rekombinanten Produktion von BacA-PCP1, BacA-Cy2 und BacA-APCP2.

Die Beladung von BacA-PCP1 erfolgte mit Leucinoyl-CoA und Sfp, BacA-APCP2 wurde entweder nach Generierung der *holo*-Form mit Sfp und CoA durch A-Domänen-Katalyse mit Cystein beladen oder bei Verwendung von fremden Substraten ebenfalls durch Beladung mit Sfp und dem entsprechenden Aminoacyl-CoA-Thioester. Die Inkubation mit der monomeren Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2 führte eindeutig zur Produktbildung Leu-Cys_{Thiazolin} (Abb. 5.19). Dabei wurde eine Nebenreaktion beobachtet, die durch den Angriff der Thiolgruppe freien Cysteins auf den

Leu-Cys^{Thiazolin}-PCP-Thioester zu der Bildung eines tripeptidischen Nebenprodukts führte. Diese unkatalysierte Nebenreaktion ist bereits für andere *in vitro* Studien von Zyklisierungs-Domänen beschrieben worden.^{89,119} Diese Ergebnisse zeigen, dass die artifizielle Trennung der Zyklisierungs-Domäne BacA-Cy2 von den umgebenden Domänen die Aktivität nicht beeinträchtigt und erlaubt die Studie der katalysierten Reaktion unabhängig von anderen Domänen. Daher wurde auch die Substratspezifität der Zyklisierungsreaktion untersucht (s. Tabelle 5.5), bei der sich eine ausgeprägte Spezifität von BacA-Cy2 zeigte, da für kein alternatives Substrat die Bildung des Produkts beobachtet werden konnte. Die Trennung einer Zyklisierungs-Domäne von dem Modulverband unter Aufrechterhaltung der Funktionalität konnte bereits durch Studien von Kelly *et al.* gezeigt werden, in denen durch rekombinante Produktion der Cy-Domäne aus der Epithalon-Synthetase EpoA die kinetischen Parameter der Zyklisierung der Vorläufer Malonyl-CoA und Cystein zu Thiazolin bestimmt wurden.¹²¹ Diese Arbeiten demonstrieren zusammen mit den hier gewonnenen Ergebnissen über BacA-Cy2, dass die Trennung einzelner Domänen von dem Modulverband der nativen NRPS eine eingehende Studie der katalysierten Reaktion ermöglicht. Auch wenn die nativen Bedingungen in diesen Systemen nicht gewährleistet sind und daher besonders die Untersuchung des zeitlichen Ablaufs verschiedener Reaktionen oder auch Domänen-Interaktions-Studien nur begrenzt möglich sind, können Untersuchungen im Modulverband unter Umständen Probleme bereiten, wie z.B. Unlöslichkeit der Proteine durch hohe Molekulargewichte oder den parallelen Ablauf mehrerer Reaktionen. Diesen Problemen kann man durch das Ausschneiden einzelner Domänen und ihrer Verwendung entgegenzutreten.

6.5 C-Domänen und verwandte Domänen in der nichtribosomalen Peptidsynthese

C-Domänen katalysieren neben der Kondensation von zwei L-Aminosäuren (^LC_L) oder einer D- und einer L-Aminosäure (^DC_L) auch andere, vielfältige Reaktionen wie bereits in Abschnitt 1.1.1.3 beschrieben wurde. Des weiteren sind Unterfamilien dieser Domänenklasse bekannt, die ähnliche Reaktionen katalysieren und sequenzielle sowie strukturelle Ähnlichkeiten zu Elongations-C-Domänen besitzen (Abb. 6.14).⁶⁴ Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung zweier Subgruppen der C-Domäne aus nichtribosomalen Peptidsynthetasen. Dabei konnte die Lipoinitiation der Biosynthesen von Surfactin und CDA aufgeklärt werden, die durch eine Initiations-C-Domäne katalysiert wird. Die hier gewonnenen Ergebnisse der

Untersuchungen zur Lipoinitiation erweitern die Vielfalt der durch C-Domänen katalysierten Reaktionen. Das Auftreten von Initiations-C-Domänen in Initiationsmodulen der NRPS, die *N*-acylierte Peptiden produzieren, spricht für ein verbreitetes Vorkommen dieser Strategie zur *N*-Acylierung von Naturstoffen. Die Verwandtschaft dieser Subgruppe von C-Domänen zu Elongations-C-Domänen wurde bereits angesprochen (s. 1.1.1.3 und 6.3).

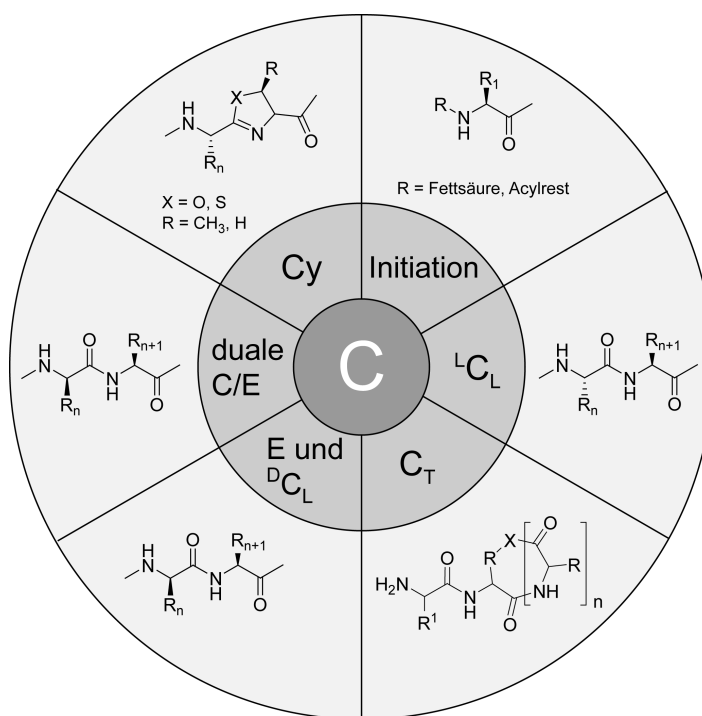


Abb. 6.14: Bekannte Subgruppen von C-Domänen. Die Verknüpfung zweier L-Aminosäuren wird durch $^L C_L$ -Domänen katalysiert. Der Einbau von D-Aminosäuren kann durch Epimerisierung durch E-Domänen und anschließende Selektion durch $^D C_L$ -Domänen oder durch duale C/E-Domänen erfolgen (s. 1.1.3.1). Heterozyklen werden durch Cy-Domänen (s. 1.1.3.2) eingeführt und *N*-Acylierungen durch Initiations-C-Domänen. In fungalen Systemen erfolgt die Makrozyklisierung des Oligopeptids durch C-terminale C_T -Domänen.

Eine weitere Unterfamilie der C-Domänen ist die Cy-Domäne, die in dieser Arbeit an einem Beispiel aus der Bacitracin-Synthetase BacA ebenfalls untersucht wurde. Neben der Eigenschaft, die Elongation des Peptids durch eine Kondensation mit einer weiteren Aminosäure zu katalysieren, bildet diese Domäne Heterozyklen mit Hilfe der Seitenketten von Serin, Threonin oder Cystein (s. 1.1.3.2). Sequenzielle und funktionelle Ähnlichkeiten sowie phylogenetische Analysen machten die Verwandtschaft zu C-Domänen deutlich, weswegen Cy-Domänen auch als Subgruppe von C-Domänen gewertet werden können.^{59,64} Neben diesen erwähnten und untersuchten Beispielen sind in Abb. 6.14 auch die weiteren, bisher bekannten Unterfamilien der C-Domäne dargestellt, zu denen auch die duale C/E-Domäne und die E-Domäne gehören. Strukturelle Studien der E-Domäne aus

TycA bestätigten kürzlich die postulierte strukturelle Ähnlichkeit zu C-Domänen.²³⁶ TycA-E wies eine ähnliche, V-förmige CAT-Faltung aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Region auf (Abb. 6.15). Das wie in C-Domänen konservierte Histidin-Motiv ist am Boden des Substratkanals zu finden. Berechnungen des pK_s -Wertes ergaben, dass auch dieses Histidin unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt und daher in der Katalyse nicht als Base, sondern vermutlich eher zur elektrostatischen Stabilisierung eines deprotonierten Übergangszustands dient. Die katalytische Notwendigkeit des Histidin-Motivs wurde durch Mutationsstudien an E-Domänen bereits nachgewiesen.¹⁰⁸ Bemerkenswert ist in der Struktur von TycA-E, dass die *bridge region* 12 Aminosäuren mehr umfasst als in vergleichbaren C-Domänen und damit den Kanal auf der Akzeptorseite deutlich schwerer zugänglich macht (Abb. 6.15), in den bei der Epimerisierung allerdings auch kein Substrat eintreten muss.

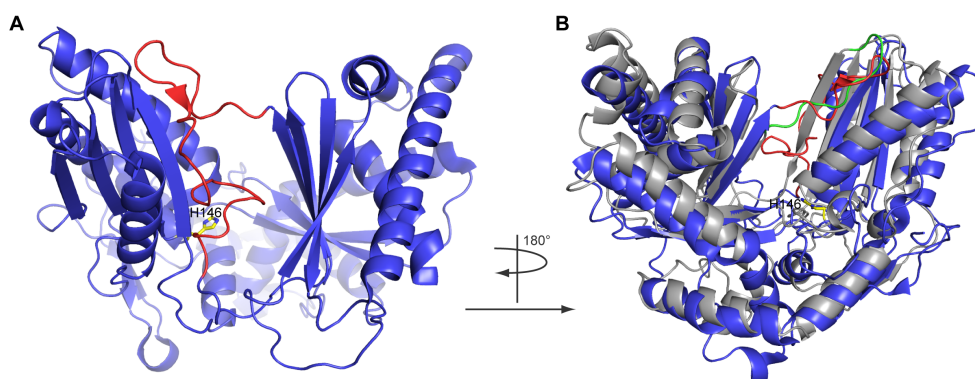


Abb. 6.15: Struktur der E-Domäne TycA-E (PDB-Code: 2XHG). A: Blick auf die Akzeptorseite der E-Domäne TycA-E. Die *bridge region* ist in rot dargestellt, das katalytisch aktive Histidin H146 ist als Stabmodell in gelb hervorgehoben. B: Überlagerung der E-Domäne TycA-E (blau) mit der C-Domäne VibH (grau, PDB-Code: 1L5A). Die *bridge region* ist in rot (TycA-E) bzw. grün (VibH) dargestellt und das katalytisch aktive Histidin der E-Domäne ist als Stabmodell in gelb hervorgehoben.

Die letzte bisher bekannte Subgruppe der C-Domänen ist erst kürzlich biochemisch charakterisiert worden und beschreibt eine Terminations-C-Domäne (C_T), die in fungalen Systemen die Freisetzung (Termination) des Oligopeptids durch Makrozyklisierung katalysiert.⁷⁸ Diese hier verdeutlichten vielfältigen Möglichkeiten der C-Domänen-vermittelten Reaktionen unterstreichen deren Bedeutung in der nichtribosomalen Peptidsynthese und tragen maßgeblich zu der Diversität der synthetisierten Naturstoffe bei.

7 Ausblick

In diesem Kapitel soll ein kurzer Überblick über Perspektiven gegeben werden, die die Ergebnisse dieser Arbeit liefern. Neben möglichen Richtungen, in die das Projekt weiterentwickelt werden könnte, werden Vorarbeiten dargestellt, die bereits während der Erstellung dieser Arbeit geleistet wurden.

7.1 Perspektiven nach Klärung der Lipoinitiationsmechanismen in CDA und Surfactin

Die Kenntnis der Substrate und Spezifitäten während der *N*-Acylierungsreaktion könnten einen wichtigen Beitrag für Strategien für das rationale Design neuer oder modifizierter Lipopeptide mit angepassten Eigenschaften für eine pharmazeutische oder biotechnologische Anwendung liefern. Durch Veränderung der Spezifitäten der Initiations-C-Domänen durch gerichtete Evolution könnte beispielsweise die eingebaute Fettsäure variiert werden, die einen wesentlichen Einfluss auf die biologische Aktivität und Toxizität hat. Auch die Spezifität für das Akzeptorsubstrat, also der Aminosäure, könnte durch gerichtete Evolution so geändert werden, dass Initiations-C-Domänen für *domain swapping* Strategien verwendet werden und so als Lipidierungswerkzeug in anderen NRPS-Maschinerien zum Einsatz kommen könnten.²³⁷⁻²³⁸ Dieser Ansatz erfordert jedoch auch die genaue Betrachtung von *downstream* auftretenden Selektivitäten und Domänen-Interaktionen, damit die Produktivität und Integrität der NRPS erhalten bleibt. Um Domänen-Interaktionen von Initiations-C-Domänen besser zu verstehen, würden sich Mutationsstudien eignen, wodurch Reste identifiziert werden könnten, die für die Interaktion mit anderen Domänen essentiell sind, denn besonders in der Initiationsreaktion von CDA konnte eine spezifische Erkennung der ACP-Domäne nachgewiesen werden (s. 5.2.3). Außerdem wäre es denkbar, Initiations-C-Domänen in chemoenzymatischen Synthesen als *N*-Acylierungsmittel einzusetzen, da diese Enzyme unter Erhaltung der Aktivität von dem Modulverband getrennt werden können, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Hierbei könnte entweder von den nativen Enzymen ausgegangen werden oder von optimierten Enzymen, die durch bereits erwähnte Strategien wie gerichtete Evolution den Anwendungen angepasst wurden.

Eine weitere Möglichkeit, die Identifizierung interaktions-assoziiierter oder auch substratbindungs-assoziiierter Reste zu erreichen, ist die Strukturaufklärung einer Initiations-C-Domäne durch

Röntgenstrukturanalyse. Hierfür ist die Kristallisation der Domäne nötig, die in ausreichenden Mengen produziert werden muss. Beide hier untersuchten C-Domänen (SrfAA-C1 und Cda-C1) ließen sich in guten Ausbeuten produzieren und reinigen und stellen damit potentielle Targets für die Proteinkristallisation dar. Ein erstes Screening und erste Optimierungen der Kristallisationsbedingungen wurden mit SrfAA-C1 während dieser Arbeit bereits durchgeführt. Es konnten erste Proteinkristalle erhalten werden, die jedoch aufgrund ihres Streuverhaltens nicht zu einer Strukturaufklärung dienen konnten (Abb. 7.1). Weitere Optimierungen und auch Kristallisationsexperimente mit Cda-C1 könnten zu der Bildung von Kristallen führen, die eine Strukturlösung ermöglichen und somit Einblicke in die ungewöhnliche Bindung eines Fettsäurerestes und die daran beteiligten Reste liefern sowie eventuell Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus geben würden. Die Kenntnis der genauen Struktur einer Initiations-C-Domäne würde außerdem Ansatzpunkte für die oben erwähnten Strategien über gerichtete Evolution liefern, die sich auf bestimmte Reste oder Strukturbereiche fokussieren könnten, die in der Ausbildung der aktiven Tasche und der Substratbindung beteiligt sind.

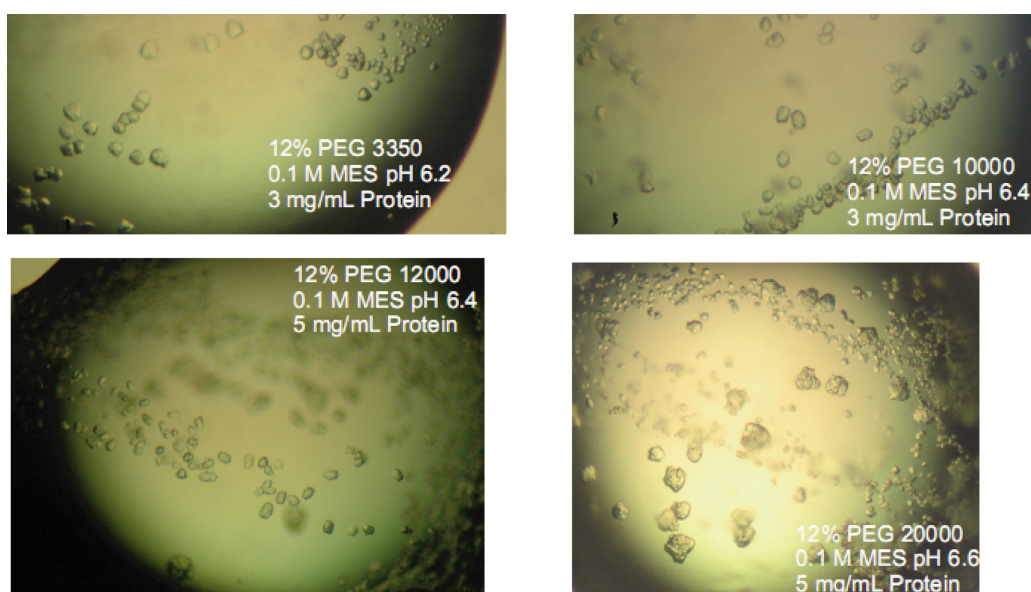


Abb. 7.1: Fotografien ausgewählter, hängender Tropfen (*hanging drop*) zur Kristallisation von SrfAA-C1 durch ein Mikroskop. Das Kristallwachstum wurde durch *seeding* mit einem in eine Impfkristall-Lösung getauchten Katzenhaar initiiert. Die Bedingung der jeweiligen Mutterlösung und die verwendete Proteinkonzentration in Hepes-Puffer (10 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) sind im jeweiligen Bild angegeben.

7.2 Zyklisierungsreaktion während der Biosynthese von Bacitracin

Die Produktion von BacA-Cy2 als freistehendes Enzym könnte in zukünftigen Studien zur weiterführenden Charakterisierung von Cy-Domänen dienen. Mutationsstudien könnten die Identifizierung weiterer Reste erlauben, die an den beiden Teilreaktionen der Cy-Domäne beteiligt sind. Die Reste N900 und S984 (in BacA) wurden von Duehrfahrt *et al.* bereits als essentielle Faktoren für die Zyklisierung jedoch nicht für die Peptidbindungsknüpfung festgestellt.¹¹⁹ Diese beiden Aminosäuren wurden auch in dem hier verwendeten Konstrukt durch ortsgerichtete Mutagenese durch Alanin substituiert (N275 und S359). Die daraus resultierenden Proteine konnten bereits in ähnlichen Ausbeuten wie der Wildtyp und in guter Reinheit erhalten werden (Abb. 7.2). Biochemische Untersuchungen würden die Bestimmung der Spezifität bezogen auf die Elongationsreaktion ermöglichen, die unter Umständen unterschiedlich zu der Spezifität des Wildtyp-Proteins sein könnte. Diese Erkenntnisse könnten für zukünftige *domain swapping* Strategien von Nutzen sein.

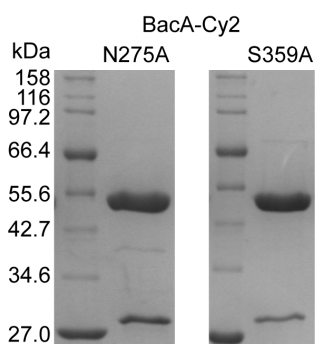


Abb. 7.2: SDS-PAGE-Analyse von BacA-Cy2 N275A (52.4 kDa) und BacA-Cy2 S359A (52.4 kDa).

Die in dieser Arbeit produzierte freistehende Cy-Domäne BacA-Cy2 könnte des weiteren für die Bestimmung kinetischer Parameter der katalysierten Reaktion verwendet werden. Diese Ergebnisse würden Aufschlüsse über Substratbindung, -umsetzung und Effektivität des Enzyms geben.

Generell zeigen die Beispiele in dieser Arbeit, dass die Produktion von einzelnen Domänen ein geeignetes Mittel sein kann, um die katalysierte Reaktion biochemisch zu untersuchen, da die Löslichkeit der kleineren Domänen im Vergleich zu ganzen Synthetasen oder Modulen häufig verbessert ist und außerdem Einzelreaktionen untersucht werden können. Diese Strategie könnte zukünftig auch für andere multimodulare Systeme angewendet werden, in denen mehrere parallel ablaufende Reaktionen oder Löslichkeitsprobleme die biochemische Untersuchung behindern.

8 Literaturverzeichnis

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **2012**, 75, 311-35.
2. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ* **2001**, 79, 780-90.
3. Giessen, T. W.; Marahiel, M. A. Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett* **2012**, 586, 2065-75.
4. Li, M. H.; Ung, P. M.; Zajkowski, J.; Garneau-Tsodikova, S.; Sherman, D. H. Automated genome mining for natural products. *BMC Bioinformatics* **2009**, 10, 185.
5. Medema, M. H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; de Jager, V.; Zakrzewski, P.; Fischbach, M. A.; Weber, T.; Takano, E.; Breitling, R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **2011**, 39, W339-46.
6. Challis, G. L.; Hopwood, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100 Suppl 2, 14555-61.
7. Romero, D.; Traxler, M. F.; Lopez, D.; Kolter, R. Antibiotics as signal molecules. *Chem Rev* **2011**, 111, 5492-505.
8. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **2000**, 406, 775-81.
9. Chambers, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **1997**, 10, 781-91.
10. Hoeffler, D.; Zimmermann, U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **1997**, 350, 739.
11. Knappe, T. A.; Linne, U.; Zirah, S.; Rebuffat, S.; Xie, X.; Marahiel, M. A. Isolation and structural characterization of capistruin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *J Am Chem Soc* **2008**, 130, 11446-54.
12. Schmidt, E. W.; Nelson, J. T.; Rasko, D. A.; Sudek, S.; Eisen, J. A.; Haygood, M. G.; Ravel, J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 7315-20.
13. Walsh, C. T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* **2004**, 303, 1805-10.
14. Caboche, S.; Pupin, M.; Leclere, V.; Fontaine, A.; Jacques, P.; Kucharov, G. NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res* **2008**, 36, D326-31.
15. Hur, G. H.; Vickery, C. R.; Burkart, M. D. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat Prod Rep* **2012**, 29, 1074-98.
16. Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **2002**, 3, 490-504.
17. Cosmina, P.; Rodriguez, F.; de Ferra, F.; Grandi, G.; Perego, M.; Venema, G.; van Sinderen, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **1993**, 8, 821-31.

18. Miao, V.; Coeffet-Legal, M. F.; Brian, P.; Brost, R.; Penn, J.; Whiting, A.; Martin, S.; Ford, R.; Parr, I.; Bouchard, M.; Silva, C. J.; Wrigley, S. K.; Baltz, R. H. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **2005**, *151*, 1507-23.
19. Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **1997**, *179*, 6843-50.
20. Gehring, A. M.; Mori, I.; Walsh, C. T. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2648-59.
21. Kessler, N.; Schuhmann, H.; Morneweg, S.; Linne, U.; Marahiel, M. A. The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 7413-9.
22. Robbel, L.; Hoyer, K. M.; Marahiel, M. A. TioS T-TE--a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodepsipeptides. *FEBS J* **2009**, *276*, 1641-53.
23. Guenzi, E.; Galli, G.; Grgurina, I.; Gross, D. C.; Grandi, G. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 32857-63.
24. Keating, T. A.; Marshall, C. G.; Walsh, C. T. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15522-30.
25. Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **2003**, *20*, 275-87.
26. von Dohren, H.; Keller, U.; Vater, J.; Zocher, R. Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem Rev* **1997**, *97*, 2675-706.
27. Gulick, A. M. Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem Biol* **2009**, *4*, 811-27.
28. Dieckmann, R.; Lee, Y. O.; van Liempt, H.; von Dohren, H.; Kleinkauf, H. Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett* **1995**, *357*, 212-6.
29. Fersht, A. R.; Mulvey, R. S.; Koch, G. L. Ligand binding and enzymic catalysis coupled through subunits in tyrosyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **1975**, *14*, 13-8.
30. Eriani, G.; Dirheimer, G.; Gangloff, J. Aspartyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: cloning and characterisation of the gene, homologies of its translated amino acid sequence with asparaginyl- and lysyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res* **1990**, *18*, 7109-18.
31. Eppelmann, K.; Stachelhaus, T.; Marahiel, M. A. Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9718-26.
32. Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **1999**, *6*, 493-505.
33. Challis, G. L. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* **2008**, *154*, 1555-69.
34. Lautru, S.; Deeth, R. J.; Bailey, L. M.; Challis, G. L. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat Chem Biol* **2005**, *1*, 265-9.
35. Villiers, B.; Hollfelder, F. Directed evolution of a gatekeeper domain in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Biol* **2011**, *18*, 1290-9.

36. Conti, E.; Stachelhaus, T.; Marahiel, M. A.; Brick, P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* **1997**, *16*, 4174-83.
37. Quadri, L. E.; Sello, J.; Keating, T. A.; Weinreb, P. H.; Walsh, C. T. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* **1998**, *5*, 631-45.
38. Baltz, R. H. Function of MbtH homologs in nonribosomal peptide biosynthesis and applications in secondary metabolite discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2011**, *38*, 1747-60.
39. Felnagle, E. A.; Barkei, J. J.; Park, H.; Podevels, A. M.; McMahon, M. D.; Drott, D. W.; Thomas, M. G. MbtH-like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8815-7.
40. Heemstra, J. R., Jr.; Walsh, C. T.; Sattely, E. S. Enzymatic tailoring of ornithine in the biosynthesis of the *Rhizobium* cyclic trihydroxamate siderophore vicibactin. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 15317-29.
41. Imker, H. J.; Krahn, D.; Clerc, J.; Kaiser, M.; Walsh, C. T. N-acylation during glidobactin biosynthesis by the tridomain nonribosomal peptide synthetase module GlbF. *Chem Biol* **2010**, *17*, 1077-83.
42. Ehmann, D. E.; Shaw-Reid, C. A.; Losey, H. C.; Walsh, C. T. The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 2509-14.
43. Stachelhaus, T.; Huser, A.; Marahiel, M. A. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* **1996**, *3*, 913-21.
44. Lambalot, R. H.; Gehring, A. M.; Flugel, R. S.; Zuber, P.; LaCelle, M.; Marahiel, M. A.; Reid, R.; Khosla, C.; Walsh, C. T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **1996**, *3*, 923-36.
45. Stein, T.; Vater, J.; Kruft, V.; Otto, A.; Wittmann-Liebold, B.; Franke, P.; Panico, M.; McDowell, R.; Morris, H. R. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 15428-35.
46. Quadri, L. E.; Weinreb, P. H.; Lei, M.; Nakano, M. M.; Zuber, P.; Walsh, C. T. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **1998**, *37*, 1585-95.
47. Mofid, M. R.; Marahiel, M. A.; Ficner, R.; Reuter, K. Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1999**, *55*, 1098-100.
48. Reuter, K.; Mofid, M. R.; Marahiel, M. A.; Ficner, R. Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO J* **1999**, *18*, 6823-31.
49. Mootz, H. D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 37289-98.
50. Gruenewald, S.; Mootz, H. D.; Stehmeier, P.; Stachelhaus, T. In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **2004**, *70*, 3282-91.
51. Sieber, S. A.; Marahiel, M. A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* **2005**, *105*, 715-38.
52. Cane, D. E.; Walsh, C. T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **1999**, *6*, R319-25.

53. Hopwood, D. A. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem Rev* **1997**, *97*, 2465-98.
54. Koglin, A.; Walsh, C. T. Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat Prod Rep* **2009**, *26*, 987-1000.
55. Koglin, A.; Mofid, M. R.; Lohr, F.; Schafer, B.; Rogov, V. V.; Blum, M. M.; Mittag, T.; Marahiel, M. A.; Bernhard, F.; Dotsch, V. Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *Science* **2006**, *312*, 273-6.
56. Koglin, A.; Lohr, F.; Bernhard, F.; Rogov, V. V.; Frueh, D. P.; Strieter, E. R.; Mofid, M. R.; Guntert, P.; Wagner, G.; Walsh, C. T.; Marahiel, M. A.; Dotsch, V. Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature* **2008**, *454*, 907-11.
57. Bergendahl, V.; Linne, U.; Marahiel, M. A. Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem* **2002**, *269*, 620-9.
58. Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Bergendahl, V.; Marahiel, M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 22773-81.
59. Keating, T. A.; Marshall, C. G.; Walsh, C. T.; Keating, A. E. The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 522-6.
60. Zhang, W.; Ntai, I.; Bolla, M. L.; Malcolmson, S. J.; Kahne, D.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T. Nine enzymes are required for assembly of the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 5240-3.
61. Belshaw, P. J.; Walsh, C. T.; Stachelhaus, T. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **1999**, *284*, 486-9.
62. Clugston, S. L.; Sieber, S. A.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. Chirality of peptide bond-forming condensation domains in nonribosomal peptide synthetases: the C5 domain of tyrocidine synthetase is a (D)C(L) catalyst. *Biochemistry* **2003**, *42*, 12095-104.
63. Ehmann, D. E.; Trauger, J. W.; Stachelhaus, T.; Walsh, C. T. Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **2000**, *7*, 765-72.
64. Rausch, C.; Hoof, I.; Weber, T.; Wohlleben, W.; Huson, D. H. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evol Biol* **2007**, *7*, 78.
65. De Crecy-Lagard, V.; Marliere, P.; Saurin, W. Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *C R Acad Sci III* **1995**, *318*, 927-36.
66. Leslie, A. G. Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* **1990**, *213*, 167-86.
67. Lewendon, A.; Murray, I. A.; Shaw, W. V.; Gibbs, M. R.; Leslie, A. G. Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyltransferase: evidence for a general base role for glutamate. *Biochemistry* **1994**, *33*, 1944-50.
68. Samel, S. A.; Schoenafinger, G.; Knappe, T. A.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O. Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure* **2007**, *15*, 781-92.
69. Tanovic, A.; Samel, S. A.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A. Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* **2008**, *321*, 659-63.
70. Zhang, W.; Ostash, B.; Walsh, C. T. Identification of the biosynthetic gene cluster for the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 16828-33.

71. Magarvey, N. A.; Ehling-Schulz, M.; Walsh, C. T. Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 10698-9.
72. Zaleta-Rivera, K.; Xu, C.; Yu, F.; Butchko, R. A.; Proctor, R. H.; Hidalgo-Lara, M. E.; Raza, A.; Dussault, P. H.; Du, L. A bidomain nonribosomal peptide synthetase encoded by FUM14 catalyzes the formation of tricarballic esters in the biosynthesis of fumonisins. *Biochemistry* **2006**, *45*, 2561-9.
73. Lin, S.; Van Lanen, S. G.; Shen, B. A free-standing condensation enzyme catalyzing ester bond formation in C-1027 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 4183-8.
74. Baltz, R. H.; Miao, V.; Wrigley, S. K. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat Prod Rep* **2005**, *22*, 717-41.
75. Robbel, L.; Knappe, T. A.; Linne, U.; Xie, X.; Marahiel, M. A. Erythrochelin--a hydroxamate-type siderophore predicted from the genome of *Saccharopolyspora erythraea*. *FEBS J* **2010**, *277*, 663-76.
76. Roche, E. D.; Walsh, C. T. Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis. *Biochemistry* **2003**, *42*, 1334-44.
77. Roongsawang, N.; Washio, K.; Morikawa, M. Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, *12*, 141-72.
78. Gao, X.; Haynes, S. W.; Ames, B. D.; Wang, P.; Vien, L. P.; Walsh, C. T.; Tang, Y. Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. *Nat Chem Biol* **2012**.
79. Kopp, F.; Marahiel, M. A. Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Natural Product Reports* **2007**, *24*, 735-49.
80. Lawen, A.; Zocher, R. Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 11355-60.
81. Magarvey, N. A.; Haltli, B.; He, M.; Greenstein, M.; Hucul, J. A. Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drug-resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50*, 2167-77.
82. Schneider, A.; Marahiel, M. A. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **1998**, *169*, 404-10.
83. Tseng, C. C.; Bruner, S. D.; Kohli, R. M.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T.; Sieber, S. A. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13350-9.
84. Blow, D. M.; Birktoft, J. J.; Hartley, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **1969**, *221*, 337-40.
85. Du, L.; Lou, L. PKS and NRPS release mechanisms. *Nat Prod Rep* **2010**, *27*, 255-78.
86. Kohli, R. M.; Trauger, J. W.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7099-108.
87. Trauger, J. W.; Kohli, R. M.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **2000**, *407*, 215-8.
88. Hubbard, B. K.; Walsh, C. T. Vancomycin assembly: nature's way. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 730-65.
89. Miller, D. A.; Walsh, C. T. Yersiniabactin synthetase: probing the recognition of carrier protein domains by the catalytic heterocyclization domains, Cy1 and Cy2, in the chain-initiating HWMP2 subunit. *Biochemistry* **2001**, *40*,

5313-21.

90. Kratzschmar, J.; Krause, M.; Marahiel, M. A. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol* **1989**, *171*, 5422-9.
91. Shaw-Reid, C. A.; Kelleher, N. L.; Losey, H. C.; Gehring, A. M.; Berg, C.; Walsh, C. T. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol* **1999**, *6*, 385-400.
92. Bruner, S. D.; Weber, T.; Kohli, R. M.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T.; Stubbs, M. T. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **2002**, *10*, 301-10.
93. Frueh, D. P.; Arthanari, H.; Koglin, A.; Vosburg, D. A.; Bennett, A. E.; Walsh, C. T.; Wagner, G. Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature* **2008**, *454*, 903-6.
94. Samel, S. A.; Wagner, B.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J Mol Biol* **2006**, *359*, 876-89.
95. Sieber, S. A.; Walsh, C. T.; Marahiel, M. A. Loading peptidyl-coenzyme A onto peptidyl carrier proteins: a novel approach in characterizing macrocyclization by thioesterase domains. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 10862-6.
96. Sieber, S. A.; Tao, J.; Walsh, C. T.; Marahiel, M. A. Peptidyl thiophenols as substrates for nonribosomal peptide cyclases. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 493-8.
97. Kopp, F.; Marahiel, M. A. Where chemistry meets biology: the chemoenzymatic synthesis of nonribosomal peptides and polyketides. *Curr Opin Biotechnol* **2007**, *18*, 513-20.
98. Kopp, F.; Mahlert, C.; Grunewald, J.; Marahiel, M. A. Peptide macrocyclization: the reductase of the nostocyclopeptide synthetase triggers the self-assembly of a macrocyclic imine. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 16478-9.
99. Strieker, M.; Tanovic, A.; Marahiel, M. A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **2010**.
100. Schwarzer, D.; Mootz, H. D.; Linne, U.; Marahiel, M. A. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 14083-8.
101. Linne, U.; Schwarzer, D.; Schroeder, G. N.; Marahiel, M. A. Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem* **2004**, *271*, 1536-45.
102. Claxton, H. B.; Akey, D. L.; Silver, M. K.; Admiraal, S. J.; Smith, J. L. Structure and functional analysis of RifR, the type II thioesterase from the rifamycin biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 5021-9.
103. Walsh, C. T.; Chen, H.; Keating, T. A.; Hubbard, B. K.; Losey, H. C.; Luo, L.; Marshall, C. G.; Miller, D. A.; Patel, H. M. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* **2001**, *5*, 525-34.
104. Dittmann, J.; Wenger, R. M.; Kleinkauf, H.; Lawen, A. Mechanism of cyclosporin A biosynthesis. Evidence for synthesis via a single linear undecapeptide precursor. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 2841-6.
105. Kraas, F. I.; Helmetag, V.; Wittmann, M.; Strieker, M.; Marahiel, M. A. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol* **2010**, *17*, 872-80.
106. Linne, U.; Doekel, S.; Marahiel, M. A. Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **2001**, *40*, 15824-34.

107. Luo, L.; Burkart, M. D.; Stachelhaus, T.; Walsh, C. T. Substrate recognition and selection by the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 11208-18.
108. Stachelhaus, T.; Walsh, C. T. Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5775-87.
109. Stein, T.; Kluge, B.; Vater, J.; Franke, P.; Otto, A.; Wittmann-Liebold, B. Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4633-42.
110. Stindl, A.; Keller, U. Epimerization of the D-valine portion in the biosynthesis of actinomycin D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9358-64.
111. Linne, U.; Marahiel, M. A. Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry* **2000**, *39*, 10439-47.
112. Luo, L.; Kohli, R. M.; Onishi, M.; Linne, U.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9184-96.
113. Linne, U.; Stein, D. B.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. Systematic and quantitative analysis of protein-protein recognition between nonribosomal peptide synthetases investigated in the tyrocidine biosynthetic template. *Biochemistry* **2003**, *42*, 5114-24.
114. Balibar, C. J.; Vaillancourt, F. H.; Walsh, C. T. Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem Biol* **2005**, *12*, 1189-200.
115. Hou, J.; Robbel, L.; Marahiel, M. A. Identification and characterization of the lysobactin biosynthetic gene cluster reveals mechanistic insights into an unusual termination module architecture. *Chem Biol* **2011**, *18*, 655-64.
116. Di Lorenzo, M.; Stork, M.; Naka, H.; Tolmasky, M. E.; Crosa, J. H. Tandem heterocyclization domains in a nonribosomal peptide synthetase essential for siderophore biosynthesis in *Vibrio anguillarum*. *Biometals* **2008**, *21*, 635-48.
117. Konz, D.; Klens, A.; Schorgendorfer, K.; Marahiel, M. A. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol* **1997**, *4*, 927-37.
118. Keating, T. A.; Miller, D. A.; Walsh, C. T. Expression, purification, and characterization of HMWP2, a 229 kDa, six domain protein subunit of Yersiniabactin synthetase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4729-39.
119. Duerfahrt, T.; Eppelmann, K.; Muller, R.; Marahiel, M. A. Rational design of a bimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chem Biol* **2004**, *11*, 261-71.
120. Marshall, C. G.; Hillson, N. J.; Walsh, C. T. Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF. *Biochemistry* **2002**, *41*, 244-50.
121. Kelly, W. L.; Hillson, N. J.; Walsh, C. T. Excision of the epothilone synthetase B cyclization domain and demonstration of in trans condensation/cyclodehydration activity. *Biochemistry* **2005**, *44*, 13385-93.
122. Marshall, C. G.; Burkart, M. D.; Keating, T. A.; Walsh, C. T. Heterocycle formation in vibriobactin biosynthesis: alternative substrate utilization and identification of a condensed intermediate. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10655-63.
123. Schneider, T. L.; Shen, B.; Walsh, C. T. Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline

to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9722-30.

124. Du, L.; Chen, M.; Sanchez, C.; Shen, B. An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol Lett* **2000**, *189*, 171-5.

125. Reimmann, C.; Patel, H. M.; Serino, L.; Barone, M.; Walsh, C. T.; Haas, D. Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2001**, *183*, 813-20.

126. Reverchon, S.; Rouanet, C.; Expert, D.; Nasser, W. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J Bacteriol* **2002**, *184*, 654-65.

127. Li, Y.; Weissman, K. J.; Muller, R. Myxochelin biosynthesis: direct evidence for two- and four-electron reduction of a carrier protein-bound thioester. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 7554-5.

128. Weber, G.; Schorgendorfer, K.; Schneider-Scherzer, E.; Leitner, E. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet* **1994**, *26*, 120-5.

129. Patel, H. M.; Walsh, C. T. In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry* **2001**, *40*, 9023-31.

130. Shi, R.; Lamb, S. S.; Zakeri, B.; Proteau, A.; Cui, Q.; Sulea, T.; Matte, A.; Wright, G. D.; Cygler, M. Structure and function of the glycopeptide N-methyltransferase MtfA, a tool for the biosynthesis of modified glycopeptide antibiotics. *Chem Biol* **2009**, *16*, 401-10.

131. Mahlert, C.; Kopp, F.; Thirlway, J.; Micklefield, J.; Marahiel, M. A. Stereospecific enzymatic transformation of alpha-ketoglutarate to (2S,3R)-3-methyl glutamate during acidic lipopeptide biosynthesis. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 12011-8.

132. Rouhiainen, L.; Paulin, L.; Suomalainen, S.; Hyytiainen, H.; Buikema, W.; Haselkorn, R.; Sivonen, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol* **2000**, *37*, 156-67.

133. Schoenafinger, G.; Schracke, N.; Linne, U.; Marahiel, M. A. Formylation domain: an essential modifying enzyme for the nonribosomal biosynthesis of linear gramicidin. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 7406-7.

134. Bosello, M.; Mielcarek, A.; Giessen, T. W.; Marahiel, M. A. An enzymatic pathway for the biosynthesis of the formylhydroxyornithine required for rhodochelin iron coordination. *Biochemistry* **2012**, *51*, 3059-66.

135. Challis, G. L.; Ravel, J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol Lett* **2000**, *187*, 111-4.

136. Hojati, Z.; Milne, C.; Harvey, B.; Gordon, L.; Borg, M.; Flett, F.; Wilkinson, B.; Sidebottom, P. J.; Rudd, B. A.; Hayes, M. A.; Smith, C. P.; Micklefield, J. Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol* **2002**, *9*, 1175-87.

137. Mulligan, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* **2005**, *133*, 183-98.

138. Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* **1968**, *31*, 488-94.

139. Kopp, F.; Linne, U.; Oberthur, M.; Marahiel, M. A. Harnessing the chemical activation inherent to carrier protein-bound thioesters for the characterization of lipopeptide fatty acid tailoring enzymes. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 2656-66.
140. Wittmann, M.; Linne, U.; Pohlmann, V.; Marahiel, M. A. Role of DptE and DptF in the lipidation reaction of daptomycin. *FEBS J* **2008**, *275*, 5343-54.
141. Bonmatin, J. M.; Laprevote, O.; Peypoux, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen* **2003**, *6*, 541-56.
142. Kakinuma, A.; Ouchida, A.; Shima, T.; Sugino, H.; Isono, M.; Tamura, G.; Arima, K. Confirmation of the Structure of Surfactin by Mass Spectrometry. *Agric. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 1669-71.
143. Bonmatin, J. M.; Genest, M.; Labbe, H.; Ptak, M. Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by 1H-NMR, distance geometry, and molecular dynamics. *Biopolymers* **1994**, *34*, 975-86.
144. Tsan, P.; Volpon, L.; Besson, F.; Lancelin, J. M. Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 1968-77.
145. Cao, X.; Wang, A. H.; Jiao, R. Z.; Wang, C. L.; Mao, D. Z.; Yan, L.; Zeng, B. Surfactin induces apoptosis and G(2)/M arrest in human breast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation. *Cell Biochem Biophys* **2009**, *55*, 163-71.
146. Kameda, Y.; Matsui, K.; Kato, H.; Yamada, T.; Sagai, H. Antitumor activity of Bacillus natto. 3. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of Bacillus natto KMD 1126. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1972**, *20*, 1551-7.
147. Nissen, E.; Pauli, G.; Vater, J.; Vollenbroich, D. Application of surfactin for mycoplasma inactivation in virus stocks. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **1997**, *33*, 414-5.
148. Tsukagoshi, N.; Tamura, G.; Arima, K. A novel protoplast-bursting factor (surfactin) obtained from bacillus subtilis IAM 1213. II. The interaction of surfactin with bacterial membranes and lipids. *Biochim Biophys Acta* **1970**, *196*, 211-4.
149. Vollenbroich, D.; Pauli, G.; Ozel, M.; Vater, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from Bacillus subtilis. *Appl Environ Microbiol* **1997**, *63*, 44-9.
150. Peypoux, F.; Bonmatin, J. M.; Wallach, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **1999**, *51*, 553-63.
151. Heerklotz, H.; Seelig, J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J* **2007**, *36*, 305-14.
152. Thimon, L.; Peypoux, F.; Maget-Dana, R.; Roux, B.; Michel, G. Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from Bacillus subtilis. *Biotechnol Appl Biochem* **1992**, *16*, 144-51.
153. Lopez, D.; Fischbach, M. A.; Chu, F.; Losick, R.; Kolter, R. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 280-5.
154. Angelini, T. E.; Roper, M.; Kolter, R.; Weitz, D. A.; Brenner, M. P. Bacillus subtilis spreads by surfing on waves of surfactant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 18109-13.
155. Nakano, M. M.; Marahiel, M. A.; Zuber, P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **1988**, *170*, 5662-8.

156. Menkhaus, M.; Ullrich, C.; Kluge, B.; Vater, J.; Vollenbroich, D.; Kamp, R. M. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 7678-84.
157. Steller, S.; Sokoll, A.; Wilde, C.; Bernhard, F.; Franke, P.; Vater, J. Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11331-43.
158. Ogura, M.; Liu, L.; Lacelle, M.; Nakano, M. M.; Zuber, P. Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **1999**, *32*, 799-812.
159. Fuma, S.; Fujishima, Y.; Corbell, N.; D'Souza, C.; Nakano, M. M.; Zuber, P.; Yamane, K. Nucleotide sequence of 5' portion of srfA that contains the region required for competence establishment in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*, 93-7.
160. Yeh, E.; Kohli, R. M.; Bruner, S. D.; Walsh, C. T. Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *Chembiochem* **2004**, *5*, 1290-3.
161. Roggiani, M.; Dubnau, D. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of srfA. *J Bacteriol* **1993**, *175*, 3182-7.
162. Yakimov, M. M.; Golyshin, P. N. ComA-dependent transcriptional activation of lichenysin A synthetase promoter in *Bacillus subtilis* cells. *Biotechnol Prog* **1997**, *13*, 757-61.
163. Lakey, J. H.; Lea, E. J.; Rudd, B. A.; Wright, H. M.; Hopwood, D. A. A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J Gen Microbiol* **1983**, *129*, 3565-73.
164. Kempter, C.; Kaiser, D.; Haag, S.; Nicholson, G.; Gnau, V.; Walk, T.; Gierling, K. H.; Decker, H.; Zöhner, H.; Jung, G.; Metzger, J. W. CDA: Calcium-Dependent Peptide Antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) Containing Unusual Residues. *Angew Chem Int Ed Engl* **1997**, *36*, 498-501.
165. Debono, M.; Barnhart, M.; Carrell, C. B.; Hoffmann, J. A.; Occolowitz, J. L.; Abbott, B. J.; Fukuda, D. S.; Hamill, R. L.; Biemann, K.; Herlihy, W. C. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*, 761-77.
166. Kirkpatrick, P.; Raja, A.; LaBonte, J.; Lebbos, J. Daptomycin. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 943-4.
167. Aretz, W.; Meiwes, J.; Seibert, G.; Vobis, G.; Wink, J. Friulimicins: novel lipopeptide antibiotics with peptidoglycan synthesis inhibiting activity from *Actinoplanes friuliensis* sp. nov. I. Taxonomic studies of the producing microorganism and fermentation. *J Antibiot (Tokyo)* **2000**, *53*, 807-15.
168. Miao, V.; Brost, R.; Chapple, J.; She, K.; Gal, M. F.; Baltz, R. H. The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2006**, *33*, 129-40.
169. Strieker, M.; Marahiel, M. A. The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics. *Chembiochem* **2009**, *10*, 607-16.
170. Counter, F. T.; Allen, N. E.; Fukuda, D. S.; Hobbs, J. N.; Ott, J.; Ensminger, P. W.; Mynderse, J. S.; Preston, D. A.; Wu, C. Y. A54145 a new lipopeptide antibiotic complex: microbiological evaluation. *J Antibiot (Tokyo)* **1990**, *43*, 616-22.
171. Debono, M.; Abbott, B. J.; Molloy, R. M.; Fukuda, D. S.; Hunt, A. H.; Daupert, V. M.; Counter, F. T.; Ott, J. L.; Carrell, C. B.; Howard, L. C.; et al. Enzymatic and chemical modifications of lipopeptide antibiotic A21978C: the synthesis and evaluation of daptomycin (LY146032). *J Antibiot (Tokyo)* **1988**, *41*, 1093-105.
172. Penn, J.; Li, X.; Whiting, A.; Latif, M.; Gibson, T.; Silva, C. J.; Brian, P.; Davies, J.; Miao, V.; Wrigley, S. K.;

- Baltz, R. H. Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2006**, *33*, 121-8.
173. Chong, P. P.; Podmore, S. M.; Kieser, H. M.; Redenbach, M.; Turgay, K.; Marahiel, M.; Hopwood, D. A.; Smith, C. P. Physical identification of a chromosomal locus encoding biosynthetic genes for the lipopeptide calcium-dependent antibiotic (CDA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **1998**, *144* (Pt 1), 193-9.
174. Powell, A.; Borg, M.; Amir-Heidari, B.; Neary, J. M.; Thirlway, J.; Wilkinson, B.; Smith, C. P.; Micklefield, J. Engineered biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified fatty acid side chains. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 15182-91.
175. Neary, J. M.; Powell, A.; Gordon, L.; Milne, C.; Flett, F.; Wilkinson, B.; Smith, C. P.; Micklefield, J. An asparagine oxygenase (AsnO) and a 3-hydroxyasparaginyl phosphotransferase (HasP) are involved in the biosynthesis of calcium-dependent lipopeptide antibiotics. *Microbiology* **2007**, *153*, 768-76.
176. Strieker, M.; Kopp, F.; Mahlert, C.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A. Mechanistic and structural basis of stereospecific C β -hydroxylation in calcium-dependent antibiotic, a daptomycin-type lipopeptide. *ACS Chem Biol* **2007**, *2*, 187-96.
177. Robbel, L.; Marahiel, M. A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 27501-8.
178. Straus, S. K.; Hancock, R. E. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 1215-23.
179. Silverman, J. A.; Perlmutter, N. G.; Shapiro, H. M. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, *47*, 2538-44.
180. Johnson, B. A.; Anker, H.; Meleney, F. L. Bacitracin: A New Antibiotic Produced by a Member of the B. Subtilis Group. *Science* **1945**, *102*, 376-7.
181. Toscano, W. A., Jr.; Storm, D. R. Bacitracin. *Pharmacol Ther* **1982**, *16*, 199-210.
182. Grunewald, J.; Marahiel, M. A. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**, *70*, 121-46.
183. Anderson, J. S.; Meadow, P. M.; Haskin, M. A.; Strominger, J. L. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. I. Utilization of uridine diphosphate acetylmuramyl pentapeptide and uridine diphosphate acetylglucosamine for peptidoglycan synthesis by particulate enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus lysodeikticus*. *Arch Biochem Biophys* **1966**, *116*, 487-515.
184. Stone, K. J.; Strominger, J. L. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1971**, *68*, 3223-7.
185. Storm, D. R. Mechanism of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. *Ann N Y Acad Sci* **1974**, *235*, 387-98.
186. Storm, D. R.; Strominger, J. L. Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J Biol Chem* **1973**, *248*, 3940-5.
187. Neumuller, A. M.; Konz, D.; Marahiel, M. A. The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem* **2001**, *268*, 3180-9.
188. Ohki, R.; Tateno, K.; Okada, Y.; Okajima, H.; Asai, K.; Sadaie, Y.; Murata, M.; Aiso, T. A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC

transporter. *J Bacteriol* **2003**, *185*, 51-9.

189. Podlesek, Z.; Comino, A.; Herzog-Velikonja, B.; Zgur-Bertok, D.; Komel, R.; Grabnar, M. *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* **1995**, *16*, 969-76.

190. Ellis, J. M.; Frahm, J. L.; Li, L. O.; Coleman, R. A. Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr Opin Lipidol* **2010**, *21*, 212-7.

191. Matsuoka, H.; Hirooka, K.; Fujita, Y. Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 5180-94.

192. Glick, B. S.; Rothman, J. E. Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* **1987**, *326*, 309-12.

193. Pfanner, N.; Orci, L.; Glick, B. S.; Amherdt, M.; Arden, S. R.; Malhotra, V.; Rothman, J. E. Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* **1989**, *59*, 95-102.

194. Bronfman, M.; Orellana, A.; Morales, M. N.; Bieri, F.; Waechter, F.; Staubli, W.; Bentley, P. Potentiation of diacylglycerol-activated protein kinase C by acyl-coenzyme A thioesters of hypolipidaemic drugs. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, *159*, 1026-31.

195. Gordon, J. I.; Duronio, R. J.; Rudnick, D. A.; Adams, S. P.; Gokel, G. W. Protein N-myristoylation. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 8647-50.

196. McLaughlin, S.; Aderem, A. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* **1995**, *20*, 272-6.

197. Korchak, H. M.; Kane, L. H.; Rossi, M. W.; Corkey, B. E. Long chain acyl coenzyme A and signaling in neutrophils. An inhibitor of acyl coenzyme A synthetase, triacsin C, inhibits superoxide anion generation and degranulation by human neutrophils. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 30281-7.

198. DiRusso, C. C.; Heimert, T. L.; Metzger, A. K. Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. Interaction with the *fadB* promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 8685-91.

199. Black, P. N.; Zhang, Q.; Weimar, J. D.; DiRusso, C. C. Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 4896-903.

200. Babbitt, P. C.; Kenyon, G. L.; Martin, B. M.; Charest, H.; Slyvestre, M.; Scholten, J. D.; Chang, K. H.; Liang, P. H.; Dunaway-Mariano, D. Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry* **1992**, *31*, 5594-604.

201. Fulda, M.; Heinz, E.; Wolter, F. P. The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rnd* at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family. *Mol Gen Genet* **1994**, *242*, 241-9.

202. Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J.; Gay, N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1982**, *1*, 945-51.

203. Cox, C. D. Deferration of laboratory media and assays for ferric and ferrous ions. *Methods Enzymol* **1994**, *235*, 315-29.

204. Schwyn, B.; Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **1987**, *160*, 47-56.
205. Barbe, V.; Cruveiller, S.; Kunst, F.; Lenoble, P.; Meurice, G.; Sekowska, A.; Vallenet, D.; Wang, T.; Moszer, I.; Medigue, C.; Danchin, A. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **2009**, *155*, 1758-75.
206. Birnboim, H. C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **1979**, *7*, 1513-23.
207. Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
208. Kuwayama, H.; Obara, S.; Morio, T.; Katoh, M.; Urushihara, H.; Tanaka, Y. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, E2.
209. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-5.
210. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-54.
211. Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-67.
212. Blecher, M. Synthesis of long-chain fatty acyl-coA thioesters using N-hydroxysuccinimide esters. *Methods Enzymol* **1981**, *72*, 404-8.
213. Hiramoto, M.; Okada, K.; Nagai, S.; Kawamoto, H. The structure of viscosin, a peptide antibiotic. I. Syntheses of D- and L-3-hydroxyacyl-L-leucine hydrazides related to viscosin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1971**, *19*, 1308-14.
214. Rottig, M.; Medema, M. H.; Blin, K.; Weber, T.; Rausch, C.; Kohlbacher, O. NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, W362-7.
215. Vater, J.; Stein, T.; Vollenbroich, D.; Kruff, V.; Wittmann-Liebold, B.; Franke, P.; Liu, L.; Zuber, P. The modular organization of multifunctional peptide synthetases. *J Protein Chem* **1997**, *16*, 557-64.
216. Kraas, F. I. Untersuchungen zur Aufklärung von Lipoinitiationsmechanismen in der nichtribosomalen Peptidsynthese. Philipps-Universität Marburg, 2009.
217. Wittmann, M. Nichtribosomale zyklische Lipopeptide: Untersuchungen zur enzymatischen Lipidierung am Beispiel von Daptomycin und Surfactin. Philipps-Universität Marburg, 2010.
218. Juguet, M.; Lautru, S.; Francou, F. X.; Nezbedova, S.; Leblond, P.; Gondry, M.; Pernodet, J. L. An iterative nonribosomal peptide synthetase assembles the pyrrole-amide antibiotic congocidine in *Streptomyces ambofaciens*. *Chem Biol* **2009**, *16*, 421-31.
219. Calderone, C. T.; Kowtoniuk, W. E.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T.; Dorrestein, P. C. Convergence of isoprene and polyketide biosynthetic machinery: isoprenyl-S-carrier proteins in the *pkcX* pathway of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 8977-82.
220. McLoughlin, S. M.; Kelleher, N. L. Monitoring multiple active sites on thiotemplate enzymes in parallel: a molecular movie of yersiniabactin bioassembly. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 14984-5.
221. Deleu, M.; Bouffloux, O.; Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Hbid, C.; Thonart, P.; Jacques, P.; Brasseur, R. Interaction of Surfactin with Membranes: A Computational Approach. *Langmuir* **2003**, *19*, 3377-85.
222. Youssef, N. H.; Duncan, K. E.; McInerney, M. J. Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of

lipopeptides for biosurfactant activity. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*, 7690-5.

223. Youssef, N. H.; Wofford, N.; McInerney, M. J. Importance of the Long-Chain Fatty Acid Beta-Hydroxylating Cytochrome P450 Enzyme YbdT for Lipopeptide Biosynthesis in *Bacillus subtilis* Strain OKB105. *Int J Mol Sci* **2011**, *12*, 1767-86.

224. Matsunaga, I.; Ueda, A.; Fujiwara, N.; Sumimoto, T.; Ichihara, K. Characterization of the ybdT gene product of *Bacillus subtilis*: novel fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450. *Lipids* **1999**, *34*, 841-6.

225. Hnida, K. Spezifitätsuntersuchungen der von verschiedenen C-Domänen katalysierten Reaktionen aus der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase SrfAA. Philipps-Universität Marburg, 2011.

226. Doekel, S.; Marahiel, M. A. Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem Biol* **2000**, *7*, 373-84.

227. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **2010**, *5*, 725-38.

228. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 40.

229. Lewis, R. A.; Nunns, L.; Thirlway, J.; Carroll, K.; Smith, C. P.; Micklefield, J. Active site modification of the beta-ketoacyl-ACP synthase FabF3 of *Streptomyces coelicolor* affects the fatty acid chain length of the CDA lipopeptides. *Chem Commun (Camb)* **2011**, *47*, 1860-2.

230. Alekseyev, V. Y.; Liu, C. W.; Cane, D. E.; Puglisi, J. D.; Khosla, C. Solution structure and proposed domain domain recognition interface of an acyl carrier protein domain from a modular polyketide synthase. *Protein Sci* **2007**, *16*, 2093-107.

231. Lai, J. R.; Fischbach, M. A.; Liu, D. R.; Walsh, C. T. A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 5314-9.

232. Hahn, M.; Stachelhaus, T. Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 15585-90.

233. Liu, Y.; Bruner, S. D. Rational manipulation of carrier-domain geometry in nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **2007**, *8*, 617-21.

234. Hansen, D. B.; Bumpus, S. B.; Aron, Z. D.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T. The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 6366-7.

235. Ikai, Y.; Oka, H.; Hayakawa, J.; Harada, K. I.; Suzuki, M. Structural characterization of bacitracin components by Frit-fast atom bombardment (FAB) liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). *J Antibiot (Tokyo)* **1992**, *45*, 1325-34.

236. Samel, S. A. Arbeiten zur strukturellen Charakterisierung von Thioesterase-, Kondensations- und Epimerisierungsdomänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen. Philipps-Universität Marburg, 2009.

237. Fischbach, M. A.; Lai, J. R.; Roche, E. D.; Walsh, C. T.; Liu, D. R. Directed evolution can rapidly improve the activity of chimeric assembly-line enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 11951-6.

238. Suo, Z. Thioesterase portability and peptidyl carrier protein swapping in yersiniabactin synthetase from *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **2005**, *44*, 4926-38.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

9.1.1 allgemeine Abkürzungen

A-Domäne	Adenylierungs-Domäne
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AL	Acylligase
ATP	Adenosintriphosphat
BC-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
Boc	<i>tertiär</i> -Butyloxycarbonyl
C-Domäne	Kondensations-Domäne
CAS	Chromazurol S
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDA	Calcium-abhängiges Antibiotikum (engl.: <i>calcium-dependent antibiotic</i>)
CoA	Coenzym A
CP	Carrier-Protein
Cy-Domäne	Zyklisierungs-Domäne
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	Dicyclohexylamin
DCM	Dichlormethan
<i>ddH₂O</i>	entionisiertes Wasser
DIPEA	Diisopropylethylenamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Difco-Sporulationsmedium
DTT	Dithiothreitol
E-Domäne	Epimerisierungs-Domäne
EI	Elektronenstoßionisation

ESI	Elektrosprayionisation
EtOAc	Essigsäureethylester
FACL	Fettsäure-Acyl-CoA-Ligase
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	engl.: <i>fast performance liquid chromatography</i>
FS	Fettsäure
HDTMA	Hexadekyltrimethylammoniumbromid
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
Hpg	Hydroxyphenylglycin
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
HS-Medium	Hochsalz-Medium
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IP	Isoprenylphosphat
IPP	Isoprenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KAS	β -Ketoacyl-ACP-Synthase
Kyn	Kynurenin
LB	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LS-Medium	Niedrigsalz-Medium (engl.: <i>low salt</i>)
MeGlu	3-Methylglutaminsäure
Mls	Makrolide-Lincosamide-Streptogramin B
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(posphat)
OD	optische Dichte
Orn	Ornithin
PADA	2-(p-[Dimethylamino]phenylazo)pyridine
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PKS	Polyketidsynthase

Ppant	4'-Phosphopantetheinyl
PPTase	4'-Phosphopantetheinyltransferase
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphate)
RMSD	mittlere quadratische Abweichung (engl.: <i>root mean square deviation</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodekylsulfat
Spc	Spectinomycin
T-Domäne	Thiolierungs-Domäne
TCA	Trichloressigsäure
TE-Domäne	Thioesterase-Domäne
TES	Triethylsilan
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
ÜNK	Übernachtkultur
UV	engl.: <i>ultra-visible</i>
WT	Wildtyp

9.1.2 Abkürzungen von proteinogenen Aminosäuren

Tab. 9.1: Verwendete Abkürzungen von proteinogenen Aminosäuren.

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Cystein	C	Cys
Asparaginsäure	D	Asp
Glutaminsäure	E	Glu
Phenylalanin	F	Phe
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code
Lysin	K	Lys
Leucin	L	Leu
Methionin	M	Met
Asparagin	N	Asn
Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln
Arginin	R	Arg
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Valin	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr

9.2 Kernmotive der essentiellen NRPS-Domänen

Tab. 9.2: Kernmotive und Funktionen, soweit bekannt, der A-Domänen.

Motiv	Sequenz	Funktion
A1	L(TS)YxEL	Struktur
A2	L(RKF)AGxAYL(VL)P(LI)D	Struktur
A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG	Katalyse
A4	FDxS	Katalyse (Bindung NH ₂ -Gruppe)
A5	NxYGPTE	Katalyse (Bindung Purin, Mg ²⁺)
A6	GELxIxGx(VL)ARGYL	Struktur
A7	Y(RK)TGDL	Katalyse (Bindung Rib-OH)
A8	GRxPxQVKIRGxRIELGEIE	Struktur (Scharnier)
A9	LPxYM(IV)P	Struktur
A10	NGK(VL)DR	Katalyse

Tab. 9.3: Kernmotive und Funktionen, soweit bekannt, der PCP-Domänen.

Motiv	Sequenz	Funktion
PCP1	LGG(DH)SL	Katalyse (Pantetheinylierung)

Tab. 9.4: Kernmotive und Funktionen, soweit bekannt, der C-Domänen.

Motiv	Sequenz	Funktion
C1	SxAQxR(LM)(WY)xL	Struktur
C2	RHExLRTxF	Struktur
C3	HHxxxDG	Katalyse
C4	YxD(FY)AVW	Struktur
C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR	Katalyse (in VibH)
C6	(HN)QD(YD)PFE	Struktur
C7	RDxSRNPL	Katalyse (in VibH)

9.3 Identifikationsnummer der verwendeten Gene

In der folgenden Tabelle sind die Identifikationsnummern (I-Nr.) der NCBI Datenbank der Genome der Organismen angegeben, die als Grundlage für die Erstellung von Oligonukleotiden dienten, und die Identifikationsnummern der jeweiligen Proteine in der Datenbank UniProtKB.

Tab. 9.5: Identifikationsnummern (I-Nr.) der verwendeten Gene in der NCBI Datenbank und der Proteine in der Datenbank UniProtKB. GI: Genidentifikationsnummer.

Gen	I-Nr. (NCBI)	Protein	I-Nr. (UniProtKB)
<i>srfAA</i>	NC_000964.3 GI: 938306	SrfAA	Q71EF5
<i>yhfT</i>	NC_000964.3 GI: 936315	YhfT	O07619
<i>acpK</i>	NC_000964.3 GI: 937952	AcpK	Q7PC63
<i>cda-PSI</i>	NC_003888 GI: 1098664	Cda-PS1	Q9Z4X6
<i>dptA</i>	AY787762 GI: 60650932	DptA	Q50E74
<i>bacA</i>	NC_006322.1	BacA	O68006

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel für die interessante und fordernde Themenstellung, die umfangreiche und exzellente Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Graumann danke ich ausdrücklich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Herrn Prof. Dr. Norbert Hampp und Herrn Prof. Ulrich Tallarek für die bereitwillige Teilnahme an der Prüfungskommission.

Tobias Gießen danke ich für die lange gemeinsame Laborarbeit mit vielen konstruktiven Gesprächen sowie für die schnelle, gründliche und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Dr. Verena Helmetag und Dr. Melanie Wittmann danke ich für die anfängliche „Starthilfe“ in dieses Projekt und für die angenehme Laborarbeit, für die ich auch Dr. Matthias Strieker und Florian Ritterbusch danke.

Ein besonders großer Dank geht an die massenspektrometrische Abteilung der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Dr. Uwe Linne für die Unterstützung bei massenspektrometrischen Analysen und an das technische und organisatorische Personal des Arbeitskreises von Prof. Marahiel aus Antje Schäfer, Christiane Bomm, Gabriele Schimpff-Weiland, Roswitha Roller-Müller und Anke Botthof, die durch ihre Unterstützung eine Menge Arbeit übernommen haben.

Meinen Forschungspraktikanten Stefan Rösner, Linda Boss, Kathrin Hnida und Sophie Franz danke ich für ihre engagierte Mitarbeit und Lernbereitschaft.

Ich danke allen Mitgliedern des Arbeitskreises für eine schöne gemeinsame Zeit, inner- wie außerhalb des Labors, und für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Ich danke meiner Familie, besonders meinen Eltern, und meinen Freunden für jahrelange Unterstützung in dieser wichtigen Zeit.

Mein größter Dank geht an Yann, für all den Mut, die Kraft und Liebe, die er mir fortwährend gibt.